Über Spezifität und Genese des basischen Vitalgranulums

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Philosophischen Fakultät

der Universität Basel

vorgelegt von

Walther Leber

aus Laufenburg

Verlagsbuchhandlung Julius Springer in Berlin

1931

Genehmigt von der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Abteilung der Philosophischen Fakultät auf Antrag der Herren Professor Dr. K. Spiro und Dr. A. Portmann

Basel, den 11. März 1931

Professor Dr. W. Matthies
Dekan

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonderabdruck aus
„Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie“
Bd. 14, Heft 3

Dem Andenken meines Vaters

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544316_0110

Inhaltsübersicht.

Seite

A. Einleitung 567
B. Das allgemeine Granulaproblem 568
C. Das Granulaproblem in der Vitalfärbung 570
D. Fragestellung 571
E. Methodisches 574
a) Material 574
b) Farbstoffe 575
c) Versuchsanordnung 575
F. Experimentelles 577
I. Ermitteln der günstigen Farbstoffkonzentration 577
a) Methylenblau 577
b) Neutralrot 577
G. Farbstoffverabreichung 578
I. *Succedane* Versuchsreihe 578
a) Vorfärben der Tiere in Methylenblau und nachfolgendes Übertragen in Neutralrot 578
b) Vorfärben der Tiere in Neutralrot und nachfolgendes Übertragen in Methylenblau 579
II. *Simultane* Versuchsreihe 580
a) Destilliertes Wasser 582
b) Prager Leitungswasser 584
c) Moldauwasser 586
H. Verschiedene Reaktionszeit von Neutralrot und Methylenblau 587
a) Methylenblau 588
b) Neutralrot 588
J. Beeinflussung der beiden Farbstoffe in Bezug auf ihre Speicherung . . 589
K. Ergebnisse und Diskussion 593
L. Zusammenfassung 601
M. Literaturverzeichnis 602

A. Einleitung.

Studien über vitale Färbungserscheinungen sind in sehr weitem Maße ausgeführt worden und doch herrscht besonders über die Kriterien, wonach wir die Vitalfärbung überhaupt beurteilen, noch sehr große Unklarheit. Wir sind heute geneigt, den ganzen Prozeß der Vitalfärbung in drei Phasen zu zerlegen: die Farbstoff*aufnahme*, die Farbstoff*speicherung* und die Farbstoff*verteilung*. Wohl die meisten der auf diesem Gebiete ausgeführten Arbeiten befassen sich mit der Farbstoffspeicherung und hoffen dadurch Einblick zu erhalten in die Morphologie und Chemie der Zelle.

Wenn wir die Speicherung, je nachdem es sich um saure oder basische Farbstoffe handelt, worauf des genaueren eingegangen werden soll, als „saure" oder „basische Granula" bezeichnen, so läßt sich über sie das folgende Zusammenfassende aussagen: Während wir seit den grundlegenden Untersuchungen von Schulemann, von v. Möllendorff u. a. annehmen können, daß das *saure* Vitalgranulum in der Zelle nicht vorgebildet ist, sondern erst durch den Einfluß des Farbstoffes auf die Zelle in derselben entsteht, also ein Reaktionsprodukt des aktiven Protoplasma darstellt, herrschen über Natur und Genese der durch *basische* Farbstoffe dargestellten Granula tiefgehende Meinungsverschiedenheiten.

Wenn es bis heute noch nicht gelungen ist, Natur und Genese des *basischen* Granulums genau zu umschreiben, so dürfte die Schuld wohl darin zu suchen sein, daß die betreffenden Forscher an ganz verschiedenen Objekten und bei ganz verschiedenen Versuchsbedingungen zu Resultaten kamen, die sich nicht direkt miteinander vergleichen lassen. Auch sind in manchen Arbeiten die Daten über Konzentration der Farbstofflösungen und über die verwendeten Lösungsmedien (destilliertes Wasser, Leitungswasser oder Wasser vom Standort der Tiere) äußerst dürftig, ja manchmal sogar weggelassen.

Die von Fischel postulierte *Spezifität* der einzelnen Granula ist zwar wiederholt angezweifelt, ihre Existenz jedoch bisher nie widerlegt oder bestätigt worden. Auch sind wir über die einzelnen in den Zellen durch Farbstoffwirkung entstandenen Gebilde recht gut orientiert, über die ersten Stadien der *Speicherung* jedoch sind die Angaben sehr lückenhaft. Gewiß ist es nicht immer leicht, diese einzelnen Prozesse zu verfolgen, besonders dann, wenn die Farbstoffwirkung supravital geprüft wird. Und doch sind es gerade die ersten Bilder der Farbstoffspeicherung, welche uns eindeutig Aufschluß geben können über die Art der Entstehung und die Natur dieser Gebilde.

Durch die methodisch aufgebauten Vorarbeiten, die vor allem durch die Prager Arbeitsgemeinschaft seit Jahren ausgeführt wurden und die darnach streben, die für den Ausbau der Vitalfärbung als selbständige wissenschaftliche Untersuchungsmethode unbedingt notwendige Bestimmung des Ladungssinnes, der Teilchengröße, Viskosität, Dichte, Ober-

flächenspannung usw. der Farbstofflösungen zu erreichen, sind wir heute in der Lage, die Bedeutung dieser einzelnen Faktoren beim Vorgang der Farbstoffspeicherung besser zu übersehen und experimentell zu beherrschen als es bisher möglich war. Selbstverständlich kann durch diese Kenntnisse auch das Problem der Granulaentstehung nur gefördert werden.

Einer Anregung von Dr. GICKLHORN folgend, habe ich daher versucht, in erster Linie die angebliche *Spezifität* der Granula zu überprüfen; gleichzeitig sollte aber auch durch diese Versuche ein Beitrag zur Genese des *basischen* Vitalgranulums geliefert werden.

Der experimentelle Teil vorliegender Arbeit wurde in Prag anläßlich eines Studienaufenthaltes von Februar—August 1930 ausgeführt. Es ist mir eine angenehme Pflicht Herrn Dr. R. KELLER für die freundliche Aufnahme und die mir zur Verfügung gestellten Mittel meinen herzlichsten Dank auszusprechen. Besonderen Dank schulde ich Herrn Dr. GICKLHORN, der mich in die Methoden und Grundlagen der Vitalfärbung einführte und mich durch so manche Anregung tatkräftig unterstützte. Diese Studie wurde dann in Basel ausgearbeitet und als Dissertation eingereicht. Den Herren Prof. SPIRO und Prof. ZSCHOKKE möchte ich auch an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und das Interesse, das sie meiner Arbeit stets entgegengebracht haben, herzlich danken. Nicht zuletzt bin ich auch Herrn Prof. HANDSCHIN für die Vermittlung dieses Studienaufenthaltes, sowie Herrn Dr. PORTMANN für manchen Ratschlag bei der Ausarbeitung des Themas sehr dankbar.

B. Das allgemeine Granulaproblem.

Bei Untersuchungen mit Vitalfarbstoffen sind „Granula" von verschiedenster Seite beschrieben und durch diesen Begriff die mannigfaltigsten Gebilde zusammengefaßt worden, die untereinander nicht morphologisch gleichwertig sind, sondern bloß die Form gemeinsam haben.

In seiner Granulatheorie nimmt ALTMANN an, daß das Protoplasma aus zahlreichen, feinen Körnchen bestehe, die in der Intergranularsubstanz verteilt liegen. Er nennt diese Gebilde „Granula" oder Bioblasten und betrachtet sie als die eigentlichen Träger des Lebens. Infolge ihrer Stellung als „Elementarorganismen" kommen ihnen auch die mannigfaltigsten Funktionen zu: „Sie wachsen durch Intussusception; sie erzeugen neue Stoffe in ihrem Innern; sie vermehren sich durch Teilung; sie besorgen das Geschäft der Kontraktilität." Wenn diese Granulatheorie den neuesten Untersuchungen auch nicht mehr standhält (HEIDENHAIN), so hat sich der Begriff „*Granulum*" in der Literatur doch sehr stark eingebürgert und vielfach auch zu Verwirrung geführt.

Bekanntlich sehen wir bei vitalen Färbungen mit sauren, besonders typisch aber mit basischen Farbstoffen bei gelungener Farbspeicherung,

körnchenartige Gebilde — heute allgemein als „Vitalgranula" bezeichnet —, gleichgültig ob es sich um präformierte Zellgebilde, um Strukturelemente oder um „Kunstprodukte", durch Einwirkung des Farbstoffes auf das Protoplasma entstanden, handelt. Ich möchte zur Orientierung in diesem Kapitel eine kurze Zusammenstellung folgen lassen, die zeigen soll, was die betreffenden Autoren unter „Granulum" verstanden, welchen Gebilden der lebenden Zelle sie diesen Ausdruck beilegten und wie sie sich dessen Entstehung dachten.

Schulemann, der sich besonders mit Studien über die Entstehung des „*sauren*" Vitalgranulums befaßt hat, nimmt an, daß durch den in die Zelle eindringenden Farbstoff, der das Protoplasma diffus durchtränkt, es zunächst zur Bildung kleinster Vakuolen kommt, in welchen sich der Farbstoff nach und nach konzentriert. Bei genügendem Farbstoffangebot wird mit wachsender Konzentration — vorausgesetzt, daß der Farbstoff zur Molekülaggregatbildung neigt — die „Polymerisation" des Farbstoffs fortschreiten bis zur Bildung mikroskopisch sichtbarer Gebilde, die schließlich frei als Farbstoffgranula im Protoplasma liegen. Dieser Ansicht huldigen auch Evans, Wilborn und v. Möllendorff. Letzterer, der das junge Granulum als eine „Vakuole" betrachtet, in der durch allmähliche Konzentration der Farbstoff ausfällt, steht aber mehr auf dem Boden der Kondensatorentheorie von Gurwitsch (1902) und möchte nicht in Abrede stellen, daß diese Vakuolen präformiert, also ständig vorhanden sind und durch die Farbstoffspeicherung nur deutlicher erscheinen.

Nach diesen Autoren handelt es sich also im Färbungseffekt der sauren Vitalfarbstoffe nicht so sehr um das Sichtbarwerden von präformierten Zelleinschlüssen, sondern vielmehr mehr oder weniger nur um Granula, die erst durch die Einwirkung des Farbstoffes auf die Zelle entstehen. Das Granulum ist also im wesentlichen ein „*Kunstprodukt*" im Protoplasma. Auch Herzfeld, die die Natur der sauren und basischen Granula näher untersuchte, kommt zum Schluß, daß den sauren Granulis keine Substanz zugrunde liegt, die den Farbstoff chemisch bindet (etwa Salzlösungen, basisches Eiweiß u. a.), sondern es handelt sich lediglich um eine „Konzentrierungserscheinung". Mit v. Möllendorff spricht sie den sauren Farbstoffen die Fähigkeit ab, präformierte, protoplasmatische Einschlüsse zu färben.

In krassem Gegensatz stehen jene Autoren, welche glauben, es handle sich in den durch saure Farbstoffe erzeugten Speicherungsbilder um das Sichtbarwerden präformierter Granula. Im Sinne der Seitenkettentheorie Ehrlichs wären dies Rezeptoren; Goldmann sieht in ihnen Produkte der inneren Sekretion, eine „merkwürdige lockere Fett-Eiweißverbindung". Pappenheim und Nakano betrachten diese Granula als protoplasmatische Plasmosomen, während Tschaschin glaubt, daß durch die Vitalfarbstoffe Chondriosomen gefärbt werden. Kiyono sieht in den Granula Elementarzellpartikelchen der normalen, funktionstüchtigen Zelle, einen „integrierenden Bestandteil des Zelleibes", die offenbar auf dem Wege der Adsorption gefärbt werden.

Anders liegen nun die Verhältnisse bei der Entstehung des *basischen* Vitalgranulums. Mitrophanow betrachtet die basischen Granula als elementare Bestandteile (im Sinne Altmanns), welchen die Zelle ihre Form verdankt und die verantwortlich sind für den Lebensprozeß der Zelle. Sie sind das morphologische Merkmal der in der Zelle sich abspielenden Reaktionen.

Nach Arnold, der sehr viel mit Neutralrot experimentiert hat, haben wir uns die Zellsubstanz als ein Gebilde vorzustellen, das aus zu Fäden aneinanderge-

reihten Elementarteilchen, den „Plasmosomen", besteht. In den durch die Vitalfärbung kenntlich gemachten Granula sieht er „umgewandelte Strukturelemente" der Zellen, die aus einer Veränderung der Plasmosomen hervorgehen; nur diese *umgewandelten* Strukturbestandteile sind färbbar. Er kommt daher zum Schluß, „daß die Granula nicht von außen aufgenommene Farbstoffpartikelchen sind, sondern einem intracellulären Vorgang ihre Entstehung verdanken". Gestützt auf Versuche an isolierten Wimperzellen, die ihm die Aneinanderreihung der Granula, ihre Verbindung durch Zwischenglieder und ihre Beziehung zu zweifellosen Strukturelementen deutlich machen, ist er der Ansicht, „daß sie selbst als wichtige Strukturbestandteile aufzufassen sind". Er bestreitet die Deutung, Plasmosomen und Granula für „Produkte der Macerationsquellung" oder ähnliche „Kunstprodukte" anzusprechen.

Fischel konnte sich mit dieser Fassung nicht zufrieden geben und stellt sich mehr auf die Seite von Flemming und betrachtet diese Granula als „Gebilde von vitaler Bedeutung", die aber auf keinen Fall als „Elementarorganismen" angesehen werden dürfen. Es sind vielmehr morphologisch wohlcharakterisierte und physiologisch aktive „Elementarorgane" der Zelle. „Das Granulum bildet ein ständiges, in einigen Fällen das hervortretendste Bauelement in der Zellarchitektur."

Recht eingehend wurden die Verhältnisse des basischen Vitalgranulums von Herzfeld und von v. Möllendorff studiert. Auf Grund ihrer vielseitigen Untersuchungen kommen die beiden Autoren zum Schluß, daß die mit basischen Vitalfarbstoffen sich färbenden Gebilde in der Regel präformiert sind, keinenfalls aber integrierende Bestandteile des Protoplasmas darstellen. Es sind vielmehr unbelebte paraplastische Einschlüsse, deren Färbevermögen oder -unvermögen abhängig ist von dem chemischen bzw. kolloidchemischen Zustand des Granulums. Vor kurzem glaubte Nagel durch seine Untersuchungen an in vitro gezüchteten Kaninchenfibrozyten für Neutralrot die v. Möllendorffsche Theorie der basischen Vitalfärbung bestätigen zu können.

Nach Chlopin soll den basischen Farbstoffen eigen sein, daß sie *nur* präexistierende Zelleinschlüsse (Vakuolen, saure Farbstoffgranula) färben. Unter Granula versteht er solche Gebilde, welche in manchen Zellarten mehr oder weniger gut charakterisierte paraplastische Einlagerungen bilden (z. B. Dotterplättchen, Einschlüsse in den Zellen u. dgl.) nicht die meistens sehr winzigen, kugeligen Gebilde, welche v. Möllendorff folgendermaßen charakterisiert: „Die Granula sind einer ständigen Veränderung unterworfene, kugelige Einschlüsse des Protoplasmas mit einem flüssigen Inhalt, der vermutlich eine wässerige Lösung kolloid gelöster Stoffe (Eiweiße, Kohlehydrate, vielleicht auch Fettsäuren) darstellt."

Während diese Autoren im Prinzip dieselbe Ansicht vertreten, das Granulum als etwas bereits Vorhandenes, Präexistierendes betrachten, sehen Meves u. Duesberg in den durch basische Farbstoffe dargestellten Zellelementen „*Kunstprodukte*".

C. Das Granulaproblem in der Vitalfärbung.

Ich habe im vorausgehenden Kapitel zu zeigen versucht, daß der Begriff „Granulum" in der Vitalfärbung nichts anderes bedeutet als die charakteristische Formerscheinung, unter welcher die vitale Färbung sichtbar wird. Die durch Vitalfarbstoffe darstellbaren „Granula" umfassen daher einen überaus heterogenen Formenreichtum, dessen einzelne Gebilde morphologisch und physiologisch von sehr verschiedener Bedeutung sind.

Den Wert und die Bedeutung der Vitalfärbung wird man jedoch erst ermessen können, wenn die Frage beantwortet ist: Was wird eigentlich durch die vitale Färbung in der Zelle sichtbar gemacht? Besonders für den Zellphysiologen ist es wichtig zu wissen, ob diese „Granula" Stoffwechselprodukte der aktiven Zelle oder ob sie morphologisch wohlcharakterisierte Gebilde der Zellstruktur darstellen, ob sie als „Artefakte", gewissermaßen durch innere Sekretion der Zelle entstanden, aufzufassen sind, oder ob es sich in ihnen im Sinne Parat u. Painlevés um Sichtbarmachung eines im Cytoplasma präexistierenden Vakuolenkomplexes (Vacuom) handelt, der oft nach der Auffassung der genannten Cytologen wenigstens in Bezug auf seine Lage mit dem Golgi-Apparat übereinstimmt.

Es geht daraus eindeutig hervor, daß wir allein auf Grund der Erscheinungsformen der vitalen Färbung am lebenden Objekt, die wir anwenden, um histologisch und zellphysiologisch Aufklärung zu erhalten, nicht in der Lage sind festzustellen, ob diese gefärbten Gebilde lebend oder toter Natur sind.

Während heute allgemein als feststehend angenommen wird, daß das *saure* Vitalgranulum erst in der lebenden Zelle entsteht, sind wir über die Natur und Genese des *basischen* Granulums noch nicht durchwegs orientiert. Trotz der zahlreichen Arbeiten auf diesem Gebiete sind die Meinungen noch sehr widersprechend.

D. Fragestellung.

Vorliegende Untersuchung wurde in der Absicht unternommen, die seit Fischel immer wieder behauptete *Spezifität* des Granulums zu überprüfen, wozu mir Doppelfärbungen besonders geeignet schienen. Durch variierende Versuchsbedingungen sollte festgestellt werden, ob es bei Anwendung von mehreren Vitalfarbstoffen zur Bildung von „*Mischgranula*" kommt, d. h. ob die Granula imstande sind, aus einem Farbstoffgemisch den einen oder anderen Farbstoff selektiv auszuwählen, also einheitlich gefärbt zu erscheinen, oder ob sie die Fähigkeit haben, mehrere Farbstoffe zugleich aufzunehmen und mischgefärbt zu erscheinen.

Doppelfärbungen verschiedenster Art sind nicht neu. An Paramäcien fand Loele, daß das basische Neutralrot und das saure Pyrrholblau getrennte Gebilde zur Darstellung bringen. Garmus hatte Erfolg an der Nickhautdrüse vom Frosch und fand bei Anwendung von Rhodamin und Methylenblau blaue Granula auf diffusem rosa Grunde. Bei Anwendung von Neutralrot und Methylenblau entstanden zuerst rote, dann blaue gesonderte Granula. Besonders auffallend sind die Resultate, die Rost an Erythrozyten des Frosches erhielt, bei Anwendung von zwei basischen Farbstoffen. Neutralrot und Nilblau färben in Mischfarbe, Neutralrot und Methylenblau nacheinander, und Neutralrot und Methylgrün ver-

drängen sich gegenseitig, nach Rost infolge verschieden starker Lipoidlöslichkeit.

Für meine Untersuchungen waren die Versuchsbedingungen und -ergebnisse Fischels bei Doppel- und Mehrfachfärbungen bei Cladoceren maßgebend. Da ich mich hauptsächlich an seine Farbstoffkombinationen hielt, möchte ich die betreffende Stelle seiner Abhandlung in extenso anführen.

„Bei Anstellung entsprechender Versuche muß naturgemäß jeder der Farbstoffe in jenem Konzentrationsgrade angewendet werden, der sonst dem Optimum seiner Wirkung entspricht. Es lassen sich ferner bei jeder Kombination zwei Versuchsarten anwenden: Jene, bei welcher die Farblösungen nacheinander auf die Tiere einwirken, und diejenige, bei welcher die Farbstoffe gleichzeitig zur Lösung gebracht werden. Die Erfahrung lehrte, daß es für den Enderfolg zumeist ohne Belang ist, ob die kombinierten Farbstoffe gleichzeitig oder nacheinander auf die Organismen einwirken.

Die nachfolgenden Angaben beziehen sich, soweit nicht anderes speziell angegeben wird, auf *Daphnia longispina*.

Neutralrot und Methylenblau.

Auch bei dieser Kombination zeigt sich die spezifische Affinität des Methylenblaus zum Haftorgan und Kiemenepithel auf das Deutlichste. Während in allen übrigen Körperteilen die reine Neutralrotfärbung hervortritt, erscheinen Kiemen und Haftorgan blau gefärbt. Es gewährt einen eigenartigen Anblick, wie diese Organe durch ihr oft tiefes Blau aus dem hellen Rot des übrigen Körpers förmlich herausleuchten. Bei stärkerer Vergrößerung erkennt man allerdings, daß sich sowohl im Haftorgan wie auch in den Kiemen einzelne, übrigens nur sehr spärliche, Neutralrotgranula vorfinden, die den Gesamteindruck des Blau nicht zu stören vermögen, aber alle anderen Granula zeigen die reine Methylenblaufärbung, wie auch diese ganzen Organe vom Methylenblau diffus durchtränkt und leicht blau gefärbt sind, besonders das Haftorgan. Ob die in diesen Organen das Neutralrot aufnehmenden Granula spezifische, von den mit Methylenblau sich färbenden verschiedene Gebilde darstellen, läßt sich nicht entscheiden; vielleicht handelt es sich um chemische (oder, was ich jedoch nicht für wahrscheinlich halte — nach Fischers bekannten Anschauungen — um physikalische) Differenzen, die durchaus nicht hochgradig zu sein brauchen. — Wie die Granula der übrigen Organe beweisen, kommt es im Gegensatz zu den früher erörterten Kombinationen zu keiner Mischung dieser beiden Farbstoffe in demselben Granulum. Denn sie zeigen die reine Neutralrotfärbung. Wohl aber können sich — und das gilt besonders von den Muskeln — neben den roten, auch noch blaue Granula vorfinden. Speziell in den Muskeln scheint es, als ob durch die beiden Farbstoffe verschiedene Granulaarten

darstellbar wären; denn die Gesamtzahl der durch die Kombinationsfärbung hervortretenden Granula ist anscheinend größer als bei Einzelwirkung der beiden Farben.

Außer in Kiemen und Haftorgan überwiegt oft der blaue Farbton im Darm und in den Leberdivertikeln. Das rührt aber hauptsächlich von der Färbung ihrer Inhaltsmassen her, nur zum Teil von blauen Granulis in ihren Zellen.

Außer bei *Daphnia longispina* wurde diese Kombination auch bei *Daphnia magna* — mit dem gleichen Erfolge — und bei *Polyphemus* versucht."

Bezüglich *Polyphemus* erwähnt Fischel weiter unten: „Hier zeigt es sich klar, daß durch die Färbung mit Neutralrot (bzw. Methylenblau) allein nicht alle in den Zellen enthaltenen Granula sichtbar gemacht werden können — denn ihre Zahl ist bei der Kombinationsfärbung größer; es gibt hier also Granula mit *verschiedener* Affinität zu den Farbstoffen."

Neutralrot und Nilblausulfat.

„Es kommt zu einer Mischfärbung, die Granula sind — in verschiedener Nuance — violett. Nur die Kiemen machen eine Ausnahme, indem sie neben violetten auch rein blaue Granula enthalten, so daß sie manchmal (bei schwacher Vergrößerung) auch in Gänze blau gefärbt erscheinen. Es rührt dies vielleicht davon her, daß sich das Nilblau rascher als das Neutralrot mit den Granulis der Kiemenzellen verbindet, die dann, zum größten Teil wenigstens, nicht mehr imstande sind, auch noch das Neutralrot anzunehmen."

In seinem großen Sammelreferat: „Vitale Färbungen an tierischen Zellen" äußert sich v. Möllendorff folgendermaßen:

„Die vitale Farbstoffreaktion aller dieser Gebilde zeigt eine große Übereinstimmung; die einzelnen Farbstoffe entfalten ihre Wirkung auf alle diese Gebilde in einem für das Einzelgebilde charakteristischen Grade, d. h. mit einem bestimmten Farbstoff schwer färbbare Gebilde werden auch mit anderen Farbstoffen schwer gefärbt.

Der letzte Satz steht im Widerspruch zu verschiedenen Angaben in der Literatur, die auf eine Spezifität bestimmter Farbstoffe gegenüber bestimmten Granula- oder Zellarten hindeuten. So beschreibt A. Fischel (1901), daß bestimmte Zellarten immer wieder Methylenblau speichern, während Neutralrot in ihnen nicht angetroffen wird. Solche Verhältnisse sind vorläufig schwer zu deuten. Bei meinen Versuchen sind derartige spezifische Färbungen ausgeblieben; ich vermute, daß dies von der Anwendungsart der Farbstoffe abhängt. Die spezifischen Färbungen einzelner Farbstoffe treten, soviel aus den Angaben der Forscher hervorgeht, nur in vitalen Versuchen ein. Ich prüfte die Wirkung der basischen Farbstoffe supravital. Durch die Herausnahme eines Organes aus dem

Organismus werden sicherlich viele spezifisch vitale Funktionen, insbesondere Oxydationen und Reduktionen stark zurückgedrängt. Manche Farbstoffe, die im lebenden Organismus entfärbt werden, vermögen die Granula im überlebenden Zustande zu färben. So wäre es z. B. auch denkbar, daß Methylenblau an sich eine größere Avidität zu allen Granulis hätte als Neutralrot, daß es aber darum vital nicht zur Wirkung kommt, weil es in den meisten Zellen reduziert wird, daß dagegen Neutralrot, als der etwas beständigere Farbstoff überall Granula färbt, wo es hingelangt. Zu denken wäre auch, daß wirklich chemische Besonderheiten der Granula zu einer spezifischen Färbung führen könnten, wenn auch die Gleichartigkeit der Wirkung in den vitalen Versuchen durch den Einfluß der lebenden Umgebung der Granula hervorgerufen werden. Jedenfalls bedürfen die „spezifischen Wirkungen" in jedem Falle der besonderen Aufklärung. So erkannte schon P. Ehrlich (1887) und M. Mitrophanow (1889), daß Methylenblau besonders an solchen Stellen Granula färbt, „wo 1. ein erhöhter oder beschleunigter Stoffwechsel statthat, und wo 2. Wachstums- und Regenerationserscheinungen vor sich gehen". In beiden Fällen dürfte die O_2-Sättigung an dem Zustandekommen der Färbung schuld sein."

Für meine Untersuchungen handelte es sich also bei dieser Sachlage darum unter variierten Versuchsbedingungen zu prüfen:

1. Gibt es *spezifische* Granula oder nicht?
2. Gibt es *Mischgranula*, wenn ja
3. Unter welchen Bedingungen entstehen sie?

E. Methodisches.

a) Material.

Als Versuchsobjekt für die folgenden Untersuchungen verwendete ich durchweg *Daphnia magna* Müller, ein Material, welches ich zu jeder Zeit und in beliebigen Mengen von den Prager Fisch- und Aquarienhandlungen beziehen konnte. Wenn ich gerade dieses Objekt für meine Versuche wählte, so lag es nicht nur im Vorteil einer durchgehenden und ausgiebigen Materialbeschaffung, sondern für mich war auch der Umstand bestimmend, daß Fischel an diesem Objekt die Versuche zur Klärung der Spezifität des Vitalgranulums ausgeführt hatte, die ich ja unter möglichst gleichen Bedingungen zu wiederholen gedachte. Auf Grund der oben erwähnten Beobachtungen und Erfahrungen v. Möllendorffs konnte es sich also nicht darum handeln, den Farbstoff supravital anzuwenden, wollte man nicht von vornherein bestimmte spezifisch vitale Funktionen ausschalten, und für die vitale Anwendung des Farbstoffes war es unbedingt notwendig, ein Versuchsobjekt zu wählen, das ohne mechanische Einwirkung die Möglichkeit einer fortgesetzten Beobachtung erlaubte und vor allem so beschaffen war, daß alterierte Zellen ohne Schwierigkeit erkannt und ausgeschaltet werden konnten um nicht zu unrichtigen Ergebnissen zu führen.

Auf die histologischen Details dieser bekannten Cladocere näher einzugehen wird sich erübrigen lassen, da durch die grundlegenden Arbeiten von Weismann, Claus und Leydig, und neuerdings durch die Monographie von Storch die Ver-

hältnisse genügend bekannt sein dürften. Auch ist in den letzten Jahren die funktionelle Bedeutung verschiedener Organe von Gicklhorn und Keller recht eingehend untersucht worden.

Da es mir vor allem darauf ankam, ein möglichst gleichmäßiges und sauberes Material zu haben, wurden die Tiere gewöhnlich während 2—3 Tagen in flachen Porzellan- oder Glasschalen gehalten, denn die ersten Vorversuche ließen erkennen, daß es nur möglich war ein einheitliches Bild sowohl in Bezug auf Farbintensität als auch Dauer der Färbung zu erhalten, wenn durch Kulturen das Material ziemlich ausgeglichen war. Diese Kulturen hatten ferner auch den Vorteil, die oft sehr stark mit lebenden Vorticellen behafteten Daphnien nach dem Häutungsprozeß sauber zu bekommen. Wie sich im Laufe der Untersuchungen herausstellte, war es vorteilhaft, als Kulturflüssigkeit mindestens 1—2 Tage altes Wasser zu verwenden, aus welchem die Luft meist verschwunden war. Frisches Leitungswasser hatte den Nachteil, daß die Tiere häufig durch entweichende Gasblasen an die Wasseroberfläche gedrückt wurden und dann nicht mehr unter Wasser kamen. Solche Individuen waren für Versuchszwecke selbstverständlich nicht mehr geeignet.

Die Kulturen wurden täglich mehrere Male von den abgestossenen Exuvien und toten oder moribunden Tieren gereinigt, da sich mit aller Deutlichkeit zeigte, daß ohne diese Maßnahme Vergiftungserscheinungen sich einstellten und die Tiere bald eingingen.

In der ersten Hälfte meiner Untersuchungen bestand das Versuchsmaterial nur aus Weibchen, erst im Sommer zeigten sich auch einzelne Männchen, die sich den Farbstoffen gegenüber genau gleich verhielten.

b) Farbstoffe.

Was die Farbstoffe betrifft, war es nicht notwendig dieselben empirisch auf ihr Vitalfärbungsvermögen zu untersuchen, handelte es sich doch hier zunächst darum die Ergebnisse Fischels zu überprüfen. Ich beschränkte mich dabei lediglich auf die Doppelfärbungsversuche mit Neutralrot und Methylenblau (beide von Grübler). Anfänglich wurden die Versuche mit Methylenblau polychromatisch ausgeführt und später zu dessen Überprüfung auch Methylenblau medicinale Höchst verwendet.

Als Stammlösung diente mir eine 0,1%ige in destilliertem Wasser kalt und frisch bereitete Lösung, welche dunkel aufbewahrt und öfters erneuert wurde.

c) Versuchsanordnung.

Aus der Stammlösung wurden vor Beginn jedes Versuches die jeweils verwendeten Konzentrationen frisch hergestellt und in Glasschalen zu 50 ccm in diffusem Tageslicht, meistens aber im Dunkeln, aufbewahrt. Diese Vorsichtsmaßnahme hatte den Zweck, die photodynamischen Wirkungen auszuschalten, welche sich bei vital gefärbten Tieren besonders deutlich bemerkbar machten. Die schädigende Wirkung des Sonnenlichtes auf mit Neutralrot und Methylenblau gefärbte Tiere hat besonders Merker untersucht und an *Neomysis vulgaris* eindeutige Resultate erhalten. Auch auf ungefärbte Tiere wirkte das direkte Sonnenlicht schädigend, wenn auch nicht in so hohem Maße.

Mittels einer weiten am Auslaufende sorgfältig abgerundeten Pipette (um die Tiere nicht zu schädigen) wurden die Daphnien aus der Kulturflüssigkeit in einen in derselben Lösung stehenden Gooch-Tiegel gebracht, und von hier, nachdem alles Wasser und kleinere Tiere (*Cyclops*) abgetropft waren, in die Versuchslösung übertragen. Diese Methode hatte den Vorteil die abgestimmte Konzentration durch Beigabe der Tiere nicht zu verändern, auch war es möglich dieselben in

allerkürzester Zeit von einem Medium ins andere zu übertragen. In Abständen von je 1 Stunde wurden die Tiere unter dem Mikroskop bei weit offener Blende untersucht und die Kulturen öfters von Exuvien und toten Tieren befreit.

Die Granulabildung wurde nur an den „Kiemen" beobachtet, da das Haftorgan als „vikariierende Kieme" nur bei jungen Individuen ausgeprägt erscheint und nur dann gut beobachtbar ist, wenn die Daphnie zufällig auf den ventralen Rand der Schale zu liegen kommt, wodurch die Dorsalseite in ihrem vollen Umfang sichtbar wird. Die durch die rhythmische Bewegung der Epipodite erschwerte Beobachtung konnte durch Auflegen eines kleinen Glimmerplättchens wesentlich erleichtert werden. Die Glimmerplättchen hatten auch den Vorteil, die Tiere möglichst wenig zu drücken, sie in ihrer Vitalität nur schwach zu hindern, was mithin eine recht lange Beobachtung erlaubte. Durch diese Maßnahme war es ferner möglich die Unterbindung des Gasaustausches auf ein Minimum zu reduzieren, die sich zwar weniger in einer Schädigung der Tiere bemerkbar machte, als vielmehr infolge Vermehrung der Reduktionsstoffe in einem raschen Ablassen der Färbung sich äußerte, besonders deutlich bei Methylenblau.

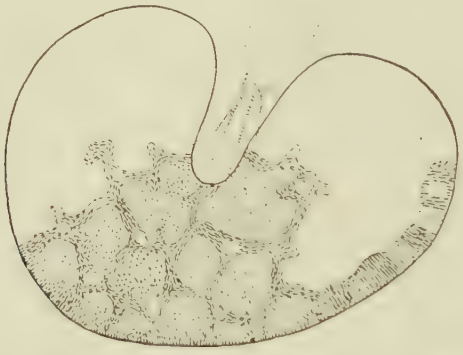

Abb. 1. Halbschematisches Bild des 5. Epipoditen. Man achte auf die Lagerung der Inhaltskörper in den Zellen, die in der Abbildung in der Aufsicht und im optischen Querschnitt eingezeichnet sind. (Nach Gicklhorn und Keller.)

Der Vollständigkeit wegen möchte ich noch etwas näher auf die histologischen Einzelheiten der Kiemenstruktur eingehen.

Während Leydig und Claus in den Epipoditen, die wir heute als *Kiemen* oder Kiemensäckchen bezeichnen und dabei auch ihre Funktion umschreiben, „eigentümlich verästigte" bzw. „unregelmäßig dendritische Figuren" gesehen haben, beobachtete Fischel, der auf Grund seiner Vitalfärbungsversuche an Cladoceren die Form der einzelnen Kiemen abgegrenzt und charakterisiert hat, eine „Felderung der Kiemenoberfläche". Fiedler hingegen unterschied an fixiertem Material deutlich zweierlei Zellformen, die durch ihre Gestalt und die Lagerung der zahlreichen Inhaltskörper differieren und die wir heute allgemein unter dem treffenden Ausdruck „Netzmaschen" und „Netzlücken" zusammenfassen (Gicklhorn u. Keller). Die Beobachtungen Fiedlers wurden später von Bernecker bestätigt. Beide Zellarten sind mit „runden, ovalen, fast stets aber kurz-stäbchenförmig gestalteten Inhaltskörpern" gefüllt, die in den „Netzlücken" meist senkrecht zur Oberfläche gelagert sind und daher in diesen Zellen nur als Punkte erscheinen, während sie in den „Netzmaschen" durch ihre Lagerung parallel zur Zellmembran eine im Sinne Fiedlers deutliche „Längsfaserung" erkennen lassen (Abb. 1).

Neuerdings haben Gicklhorn und Keller die Verschiedenheit dieser beiden Zellarten in physiologischer Richtung mit Hilfe vitaler Elektivfärbung deutlich bewiesen und festgestellt, daß der Ausdruck „Kieme" für diese epipodialen Anhänge durchaus gerechtfertigt ist und daß die „Netzlucken" Orte vorwiegender Oxydation, die „Netzmaschen" Orte vorwiegender Reduktion darstellen.

F. Experimentelles.

I. Ermitteln der günstigen Farbstoffkonzentration.

Diese Vorversuche hatten den Zweck experimentell zu ermitteln, welche Farbstoffkonzentration dem Optimum des Färbungsbildes entspricht, also festzustellen, welcher Konzentrationsgrad von den Tieren, ohne sie zu schädigen, leicht ertragen werden kann und der in verhältnismäßig kurzer Zeit ein normales intensives Speicherungsbild ergibt. Der kurzen Lebenszeit der Tiere angepaßt wählte ich als Färbungsdauer 12—24 Stunden, wobei ich gewöhnlich so vorging, daß ich die Tiere am Abend in die Lösungen brachte, um am folgenden Tage je nach den Versuchsbedingungen ihre Speicherungsbilder kontrollieren zu können. Mit dieser Färbungsdauer wurde auch erreicht, die Farblösung möglichst verdünnt anwenden zu können und so die Tiere durch den dargebotenen Farbstoff in ihrer Vitalität nicht zu schädigen, was wiederum den Vorteil einer langsam verlaufenden, normalen Farbstoffspeicherung zur Folge hatte.

a) Methylenblau.

Ausgehend von der 0,1%igen Lösung wurden folgende Verdünnungsgrade hergestellt: $^1/_4$, $^1/_8$, $^1/_{16}$, $^1/_{32}$, $^1/_{64}$, $^1/_{128}$, $^1/_{256}$ bzw. 0,025, 0,012 usw. bis 0,0004%.

Die ersten vier Konzentrationen zeigten sich sehr bald als ungünstig nicht nur infolge ihrer Giftigkeit auf die Tiere, sondern auch infolge ihrer Art der Farbspeicherung. Da der Farbstoff in diesen Verdünnungsgraden sämtliche Teile des Körpers tingierte, war es nicht möglich eine reine elektive Kiemenfärbung zu erhalten, was zur Folge hatte, daß jegliche Beobachtung der Farbstoffspeicherung verunmöglicht wurde. Selbst Konzentration $^1/_{64}$ erwies sich noch ungünstig, indem es hier zwar nicht mehr zu einer vollständigen Tinktion des Tieres kam, doch war nur in den seltensten Fällen eine granuläre Speicherung zu erkennen.

Während andererseits die Konzentration $^1/_{256}$ innerhalb 24 Stunden eine noch nicht abgeschlossene Färbung zeigte, erwies sich Konzentration $^1/_{128}$ als sehr günstig, indem außer den Kiemen nur noch Cölomsäckchen, Antennendrüse und Muskulatur schwach gefärbt waren.

Methylenblau polychromatisch und Methylenblau medicinale verhielten sich in Bezug auf Zeit und optimale Wirkung gleich.

b) Neutralrot.

In gleicher Weise wurde die günstige Konzentration auch für Neutralrot ermittelt. Auch hier erwiesen sich Konzentrationen bis und mit $^1/_2$ als schädlich und ungünstig im Färbungsbild. Da die Proben, wie übrigens auch die des Methylenblaus, im Dunkeln aufgestellt waren, konnte es sich bei diesen Erscheinungen nicht um photodynamische Wirkung handeln.

Auch für Neutralrot erwies sich Konzentration $^1/_{128}$ als günstig. Bei diesem Verdünnungsgrad zeigte sich noch mehr als bei Methylenblau eine schwache, allgemeine Färbung des Körpers. Immerhin war dieselbe nicht so stark, daß dadurch die Beobachtung der Farbstoffspeicherung in den Kiemen verunmöglicht worden wäre.

Auch bei Neutralrot waren schon nach einigen Stunden die ersten Granula zu erkennen; doch handelte es sich auch hier in erster Linie nur darum das fertige Bild der Speicherung mit Rücksicht auf die Zeit zu beobachten.

G. Farbstoffverabreichung.

Nach diesen orientierenden Versuchen war es nun möglich Doppelfärbungen auszuführen. FISCHEL sagt in seiner Arbeit, daß es nicht von Bedeutung sei, *wie* der Farbstoff angewendet werde, daß es für den Enderfolg ohne Belang sei, ob die Farbstoffe gemischt und gleichzeitig oder einzeln und nacheinander auf die Tiere einwirken.

Ich bin dieser Frage nachgegangen und habe die folgenden Versuche in der Absicht ausgeführt, die Richtigkeit dieser Annahme zu prüfen, indem ich die Daphnien, durch einen Farbstoff vorgefärbt, in den zweiten übertrug und so die *succedane* Wirkung verfolgte und andererseits die Tiere in das Farbgemisch brachte, um die *simultane* Wirkung beider Farbstoffe zusammen zu prüfen.

I. Succedane Versuchsreihe.

a) Vorfärben der Tiere in Methylenblau und nachfolgendes Übertragen in Neutralrot.

Für diese Versuchsserien war es besonders wichtig, daß die vorgefärbten Tiere *vor* der vollständigen Farbstoffspeicherung in die zweite Lösung übertragen wurden. Um daher möglichst viele Speicherungstypen zu erhalten, kamen die Tiere in Methylenblaulösungen, die, ausgehend von einer 0,0008%igen Lösung, wie folgt verdünnt waren:

Methylenblau:	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	Teile
Leitungswasser:	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	„

Durch diese Maßnahme war es möglich, nach einer bestimmten Zeit verschiedene Stadien der Farbstoffspeicherung und verschieden intensiv gefärbte Granula zu erhalten. In diesen Konzentrationen verblieben die Tiere etwa 12 Stunden und wurden dann in Neutralrotlösungen gebracht, die, von der gleichen Konzentration ausgehend, entsprechend verdünnt worden waren. Während im Momente der Übertragung die ersten Konzentrationen schon weit fortgeschrittene und ziemlich intensive Farbspeicherung zeigten, war dieselbe in den letzten Konzentrationen noch in ihren Anfangsstadien, ja sogar kaum sichtbar.

Der Entwicklung der Farbstoffspeicherung wurde für diese orientierenden Versuche vorläufig keine besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Von besonderem Interesse war vor allem das Endresultat: *Spezifische* Granula oder *Misch*granula?

Nach weiteren 12 Stunden wurden die Proben wieder untersucht und ergaben folgendes Bild:

Die ersten sechs Konzentrationen zeigten weder rote noch Mischgranula, sondern durchwegs nur blaue Granula von verschiedener Größe und verschiedener Form. In den stärkeren Konzentrationen waren die einzelnen Granula zum Teil zu Vakuolen verschmolzen. Die Kiemen sämtlicher sechs Proben zeigten ein durchwegs einheitliches Bild in Bezug auf ihre Farbtönung. Auffallend war vor allem die Tatsache, daß die Methylenblaufärbung in der Neutralrotlösung sehr gut erhalten blieb.

Etwas anders verhielten sich die Tiere in den letzten vier Konzentrationen. Wenn auch hier die Mischgranula fehlten, so waren doch neben reinen blauen auch *rein rote* Granula zu erkennen. Auf die Verteilung derselben und ihre Beziehung zu den blauen Granula werde ich in einem späteren Kapitel noch zu sprechen kommen.

In gleicher Weise wurden die Versuche auch mit destilliertem Wasser durchgeführt: Von einer geringeren Vitalität der Tiere abgesehen, waren in diesem Medium keine prinzipiellen Unterschiede zu erkennen. Wenn auch Form und Größe der Granula im destillierten Wasser ein anderes Speicherungsbild erkennen ließen als im Leitungswasser, fehlten doch auch hier die Mischgranula.

b) Vorfärben der Tiere in Neutralrot und nachfolgendes Übertragen in Methylenblau.

In ganz analoger Weise wurden auch bei Neutralrot, ausgehend von einer 0,0008%igen Lösung, die verschiedenen Verdünnungsgrade hergestellt und die Tiere während 12 Stunden in den verschiedenen Lösungen gehalten, um nach Ablauf dieser Zeit in die entsprechenden Konzentrationsgrade des Methylenblaus gebracht zu werden.

Auch hier wurde zunächst nicht auf die verschiedenen Phasen der Speicherung geachtet, sondern erst nach weiteren 12 Stunden das Endresultat beobachtet, das folgendes Bild zeigte:

In den stärkeren Konzentrationen dominierten die roten Granula; dazwischen waren aber auch vereinzelte blaue zu erkennen, die mit abnehmender Konzentration immer zahlreicher wurden.

In den schwächeren Konzentrationen traten nun deutlich Mischgranula auf, welche besonders auffallend in der 4. und 5. Kieme erschienen, während sie in den anderen zwar auch, jedoch nur vereinzelt anzutreffen waren. Daneben waren deutlich auch rote und blaue Granula zu erkennen. Während in den stärkeren Konzentrationen die Granula sich meistens zu Vakuolen verschmolzen, in denen dann der Farbstoff ausflockte, trat in den schwächeren Konzentrationen recht auffallend in Erscheinung, daß die Granula nicht koagulierten.

Nach diesen Feststellungen war es wünschenswert, den Speicherungsprozeß des Methylenblaus an mit Neutralrot vorgefärbten Tieren in den verschiedenen Phasen zu verfolgen.

Entsprechende Versuche zeigten, daß schon nach 1 Stunde zwischen den roten Granulis kleine „staubfeine" blaue Granula auftreten, besonders deutlich in der 5. Kieme. Dieselben werden nach und nach größer und verteilen sich nun abgestuft auf die übrigen Kiemen. Schon nach 2 Stunden sind die ersten *Mischgranula* zu erkennen, die sich anfänglich als violett gefärbte Granula, später als violett gefärbte Vakuolen deutlich von den roten und blauen Granulis abheben und ihre Entstehung offenbar dem Verschmelzen von roten und blauen Gebilden verdanken, wobei allerdings nicht außer acht gelassen werden darf, daß die violetten Granula auch durch Aufnahme des Methylenblaus in rote Granula entstanden sein könnten. Über das weitere Schicksal einer solchen violetten „Vakuole" möchte ich im Zusammenhang mit anderen Erscheinungen weiter unten berichten.

Während, wie wir oben gesehen haben, das Methylenblau im Neutralrot sehr gut erhalten bleibt, verschwindet umgekehrt das Neutralrot in der Methylenblaulösung nach und nach um den violetten und blauen Granulis Platz zu machen.

Es geht aus diesen beiden Versuchsserien eindeutig hervor, daß die beiden Farbstoffe Methylenblau und Neutralrot in Bezug auf ihr vitales Färbungsvermögen in einem gewissen Abhängigkeitsverhältnis zueinander stehen müssen, da nur in ganz bestimmten Fällen Doppelfärbungen, also Mischgranula, zu erzielen sind.

Inwieweit Art und Weise der Farbstoffverabreichung daran beteiligt sind, sollten die folgenden Versuche klarlegen, bei welchen die Farbstoffe gleichzeitig, *simultan*, verabreicht wurden.

II. Simultane Versuchsreihe.

Daß eine gegenseitige Beziehung zwischen Neutralrot und Methylenblau besteht, haben wir schon bei der succedanen Farbstoffverabreichung gesehen. Bei der simultanen Einwirkung der Farbstoffe mußte nun in erster Linie festgestellt werden, in welchem Verhältnis die beiden Farbstoffe zu mischen sind, damit es mit größter Sicherheit zur Bildung von Mischgranula kommt, d. h. das Mischungsverhältnis der Farbstoffe experimentell zu ermitteln, welches quasi einen Gleichgewichtszustand beider Lösungen schafft, wodurch eine gleichmäßige Farbstoffspeicherung in den Zellen gewährleistet werden kann.

Zu diesem Zwecke wurden folgende orientierende Versuche ausgeführt. Ausgehend von einer 0,0008%igen Neutralrot- und ebensolchen Methylenblaulösung wurden mit destilliertem Wasser folgende Mischungen hergestellt:

Neutralrot:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Teile
Methylenblau:	9	8	7	6	5	4	3	2	1	„

Als Versuchsgefäße wurden wieder Glasschalen mit 50 ccm Lösung verwendet, in welche aus der Kulturlösung mit Hilfe des Gooch-Tiegels etwa 20—30 Daphnien übertragen wurden.

Neutralrot 1: Methylenblau 9. Schon nach kurzer Zeit sind in den Kiemen die ersten blauen Granula zu beobachten, während der übrige Teil des Tieres farblos ist. Selbst nach 24 Stunden ist das Bild noch gleich, indem auch jetzt in den Kiemen noch keine roten Granula zu sehen sind. Auffallend ist hingegen die rein rote Färbung der Speicheldrüse inmitten des sonst nur blau gefärbten Tieres.

Nr. 2: Methylenblau 8. Im Prinzip zeigt dieses Mengenverhältnis denselben Färbungseffekt. Auch in dieser Lösung weisen die Kiemen selbst nach 24 Stunden nur blaue Granula auf. Rein blau granulär sind auch die Nephridialschleifen gefärbt, während Speicheldrüse und Cölomsäckchen rote Granula aufweisen. In der Antennenmuskulatur sind rote und blaue Granula nebeneinander zu sehen.

Nr. 3: Methylenblau 7. Zum ersten Male treten hier vereinzelte rote Granula auf und zwar hauptsächlich in der ersten Kieme. Die Antennenmuskulatur zeigt blaue, rote und Mischgranula. Speicheldrüse und Cölomsäckchen weisen intensive Neutralrotfärbung auf. Die jüngeren Individuen zeigen nur blaue Granula in den Kiemen. An den noch im Brutraum sich befindenden Embryonen ist das Haftorgan, die „vikariierende Kieme" (Gicklhorn u. Keller), deutlich blau granulär gefärbt.

Nr. 4: Methylenblau 6. Die roten Granula erscheinen in weit stärkerem Maße und sind besonders in der ersten Kieme recht auffallend, während sie in der fünften nur spärlich auftreten. Der blaue Ton ist noch vorherrschend. Bei einzelnen Individuen kommt die verschieden intensive Färbung der Kiemen durch Methylenblau recht deutlich zur Geltung, indem die erste Kieme nur schwach gefärbt ist, die fünfte aber eine intensive Methylenblauspeicherung aufweist. Antennenmuskulatur, Nephridialschleifen und Speicheldrüse zeigen dasselbe Verhalten wie in den vorhergehenden Konzentrationen.

Nr. 5: Methylenblau 5. *Zum erstenmal treten in diesem Mischungsverhältnis besonders in der 5. Kieme vereinzelte Mischgranula auf.* Daneben sind nur blaue Granula zu sehen während die roten noch gänzlich fehlen. Auffallend ist die Tatsache, daß meist nur junge, in voller Vitalität sich befindende Individuen die violetten Granula aufweisen, während ältere Tiere meist nur blaue und nur wenig rote Granula zeigen. Die Mischgranula sind meist randständig und in wechselnder Form anzutreffen. In den übrigen Organen sind keine nennenswerten Erscheinungen zu sehen.

Nr. 6: Methylenblau 4. Die Mischgranula beginnen nun mit ziemlicher Regelmäßigkeit aufzutreten und sich auf alle Kiemen zu verteilen.

Das Methylenblau übertönt noch stark die violetten und roten Farbstoffgebilde.

Die bis anhin besprochenen Färbungserscheinungen treffen sowohl für Versuchsserien in Leitungswasser wie auch für solche in destilliertem Wasser zu. Wenn auch die Erscheinungsformen der Speicherungsbilder, der Granula im eigentlichsten Sinne, je nach dem verwendeten Lösungsmedium im einzelnen besonderen Charakter aufweisen, ist der Endeffekt im Prinzip doch immer derselbe.

Da nun in den folgenden Mengenverhältnissen die Mischgranula regelmäßig in den Kiemen erschienen und in den vorangehenden Mischungen sich deutlich zeigte, daß Art und Weise der Farbstoffablagerung in der Zelle, mithin Form und Größe des Granulums, von dem verwendeten Lösungsmittel in weitem Maße abhängig ist, möchte ich die Ergebnisse der folgenden Mengenverhältnisse gesondert aufführen und im einzelnen auch auf den Prozeß der Farbstoffspeicherung und die Bildung des Mischgranulums eingehen.

a) Destilliertes Wasser.

Nr. 7: Methylenblau 3. Schon nach kurzer Zeit sind die ersten roten und blauen Granula zu erkennen und zeigen durch ihre Art der Speicherung und ihre Farbintensität einen klaren Unterschied zwischen den einzelnen Kiemen, wie bereits oben erwähnt. Schon nach wenigen Stunden treten Mischgranula auf. Dieselben beginnen in der 5. Kieme, greifen nach einiger Zeit auch auf die anderen über und zeigen schließlich nach einigen Stunden ein einheitliches Bild. Auch hier treten sie zunächst randständig auf, verteilen sich aber nach und nach über die ganze Kiemenfläche. Sie haben die Form von kleinen runden Tröpfchen und sind hauptsächlich um den farblosen Kern gruppiert (Abb. 2). Nach mehreren Stunden treten auch Vakuolen auf, die manchmal den ganzen Zellraum ausfüllen.

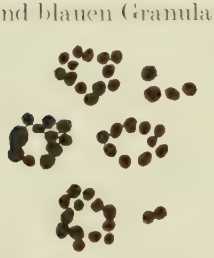

Abb. 2. Runde, tröpfchenförmige Neutralrot -> <- granula. Charakteristische Form im dest. Wasser.

Nr. 8: Methylenblau 2. In den ersten Stadien der Farbstoffspeicherung ist ein deutliches Überhandnehmen der roten Granula zu konstatieren, doch sind auch die blauen noch recht häufig zu erkennen. Nach einigen Stunden treten auch hier Mischgranula auf, jedoch nicht mehr so ausgeprägt und so zahlreich wie in der vorangehenden Lösung.

Einzelne Individuen zeigen auch besonders interessante Bilder der Darmfärbung. Während der cephale Teil des Darmes nur rein rote Granula zeigt, sind im abdominalen Teile desselben nur violette zu erkennen. Die Ringmuskulatur des Darmes weist rein blaue Granula auf. Das verschiedene Verhalten der beiden Darmabschnitte beobachtete ich in dieser Lösung zum erstenmal, doch konnte diese Erscheinung auch in Kontroll-

lösungen von gleichem Mischungsverhältnis stets wiedergefunden werden. Auf eine Deutung dieser Färbungsunterschiede muß vorläufig verzichtet werden, doch dürften funktionelle Unterschiede dabei von Bedeutung sein.

Nr. 9: Methylenblau 1. Die Mischgranula treten nur noch selten auf und sind meist auf die 5. Kieme beschränkt. Obschon noch recht viele blaue Granula zu erkennen sind, überwiegen die roten doch beträchtlich.

Auch diese Lösung zeigt wieder das eben erwähnte Verhalten des Darmes. Es handelt sich dabei nicht um eine diffuse Lumenfärbung, sondern um granuläre Farbspeicherung in den Epithelzellen.

In allen Versuchen mit destilliertem Wasser machte sich eine verminderte Vitalität der Tiere sehr unangenehm bemerkbar. Nur in den wenigsten Fällen war es möglich, das Endstadium der Farbstoffspeicherung zu erhalten, indem die Tiere meist schon vorher eingingen, oder aber so alteriert waren, daß das Speicherungsbild auf keinen Fall dem einer normalen funktionstüchtigen Zelle entsprach.

Da diese Untersuchungen während der heißen Sommermonate ausgeführt wurden, glaubte ich zuerst an eine Schädigung des Materials durch den Transport, mußte aber bald von dieser Meinung ablassen, indem Kontrolltiere desselben Materials in Leitungswasser mehrere Tage in voller Vitalität gehalten werden konnten. Ich brachte hierauf die Tiere in Kulturlösungen, denen ich reichlich destilliertes Wasser beigab, um sie so vor der Übertragung in das Versuchsmedium ans destillierte Wasser zu gewöhnen. Weder diese Maßnahme, noch das Aufstellen der Schalen im dunklen Kasten, um photodynamische Erscheinungen vollständig auszuschalten, noch das Aufstellen der Schalen (ebenfalls dunkel) auf dem kalten Fußboden hatte Erfolg. Da die Tiere in reinem destillierten Wasser sich gut hielten, liegt der Verdacht sehr nahe, daß der Farbstoff in destilliertem Wasser bei einer erhöhten Temperatur stark giftig wirkt.

Da sich die Tiere im Leitungswasser, trotz ziemlich hoher Außentemperatur, während mehreren Tagen sehr gut hielten, wurde der Prozeß der Farbspeicherung recht eingehend in diesem Medium verfolgt.

Auf Grund der Vorversuche mit Leitungswasser und der Ergebnisse mit destilliertem Wasser ließ sich deutlich erkennen, daß Mischgranula besonders häufig und vor allem regelmäßig nur in den Lösungen Nr. 7: Methylenblau 3 und Nr. 8: Methylenblau 2 entstehen; ich werde daher im folgenden nur noch auf diese beiden Versuchsserien eingehen und die anderen Mengenverhältnisse, die zur Kontrolle auch ausgeführt wurden, unberücksichtigt lassen, um so mehr als in denselben nie ein abnormales Bild der Farbspeicherung zu erkennen war.

b) Prager Leitungswasser.

Nr. 7: Methylenblau 3. Für diese Versuche verwendete ich hauptsächlich Material, das während zwei Tagen in den Kulturschalen gehalten wurde.

Auffallend ist vor allem die Erscheinung, daß sämtliche, sowohl blaue wie rote Granula, nur in den „Netzlücken" zu sehen sind, während die „Netzmaschen" vollständig farblos bleiben. Im Gegensatz zu den Bildern im destillierten Wasser sind hier die einzelnen Granula nicht von runder, tröpfchenartiger Gestalt, sondern sind als feine Punkte von unbestimmter Gestalt zu erkennen. Diese Gebilde werden nach und nach größer ohne ihre Form wesentlich zu verändern. Die einzelnen Granula sind besonders dicht um den Kern angeordnet, während die Randpartie der Zelle nur wenig gefärbte Partikel aufweist. Doch dieses Bild ist nicht von langer Dauer; denn schon nach wenigen Stunden treten die ersten Mischgranula auf, deren Entstehung deutlich unter dem Mikroskop verfolgt werden kann. Die Beobachtung ist allerdings nicht sehr einfach, da die Tiere nicht zugedeckt werden dürfen, um das besonders bei Methylenblau ausgeprägte Nachlassen der Farbintensität zu verhindern, andererseits ist es auch recht schwierig, die so ungehemmten Tiere längere Zeit zu kontrollieren. Bei genügend großer Geduld gelingt es aber doch nach einiger Zeit, dieselben Zellen wieder einzustellen und den Fortgang der Entwicklung zu verfolgen.

Die Veränderung des Bildes der Farbstoffspeicherung ist nun sehr charakteristisch. Die kleinen Granula werden immer größer bis sie sich schließlich berühren und dann bald runde, tropfenförmige Gestalt annehmen (Abb. 3). *Treten nun solche von gleicher Farbspeicherung zusammen, so resultiert daraus ein einheitliches rotes oder blaues Granulum, treten jedoch solche von verschiedener Speicherung zusammen, so entsteht als Endbild das Mischgranulum.* Steht der Zelle noch reichlich Farbstoff zur Verfügung, so wird die Zahl der tropfigen Granula immer größer und es kann sogar zu einer einzigen violettgefärbten Vakuole führen (dasselbe Phänomen, das wir schon früher gesehen haben), die den ganzen Zellraum erfüllen kann. Die Farbintensität einer solchen Vakuole steht bedeutend hinter der des Granulums zurück und bei weiterer Farbstoffzufuhr, was auch eine weitere Farbstoffspeicherung in der Zelle zur Folge hat, tritt folgende Erscheinung ein:

Der violette Inhalt der Zelle wird nach und nach intensiver gefärbt und nach einigen Stunden ist der Farbstoff ausgeflockt und tritt als Randfällung deutlich hervor, während der übrige Inhalt der Zelle fast farblos erscheint. Je nach der Menge des in der Vakuole gelöst vorhandenen Farbstoffes werden die Randfällungen rot oder blau erscheinen. Was weiter mit diesen Gebilden geschieht, konnte nicht verfolgt werden, da die Tiere nach diesem ohnehin schon 2 Tage dauernden Prozeß nicht

mehr in voller Vitalität waren; andererseits handelte es sich auch nicht darum, das Schicksal einer derart veränderten Zelle zu verfolgen, sondern mir lag es mehr daran, das erste Auftreten der Farbstoffspeicherung bis zu einem gewissen Endstadium zu beobachten. Und als solches glaube ich den Speicherungstypus der flockenförmigen Granula ansehen zu dürfen; denn die Vakuolenbildung, die übrigens unterbunden werden kann, wenn man die Tiere nach kräftiger Speicherung in farbfreies Leitungswasser zurückbringt, scheint doch eine pathologische Veränderung der Zelle zu sein, die auf Grund vermehrter Farbstoffzufuhr zustande kommt. Diese Annahme scheint mir um so mehr berechtigt, als besonders in der

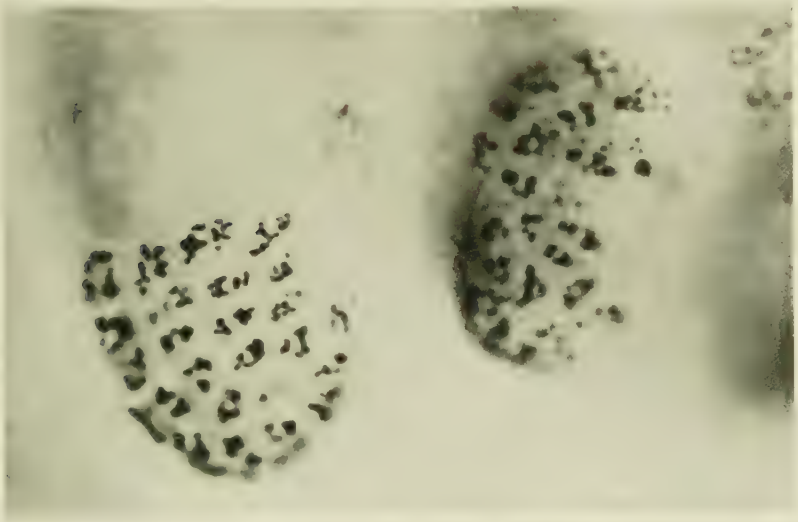

Abb. 3. Kiemensäckchen mit Methylenblau elektiv gefärbt. Netzlücken als Oxydationsorte. Feine tropfenförmige Granula in charakteristischer Lagerung um den farblosen Kern.

4. und 5. Kieme die Vakuolenbildung recht häufig zu erkennen ist, da wir ja schon früher gesehen haben, daß die Farbstoffspeicherung in diesen beiden Kiemen am intensivsten eintritt.

Im Mischungsverhältnis Nr. 7: Methylenblau 3 zeigt sich auch recht deutlich ein physiologischer Unterschied der einzelnen Zellen der Kieme. Betrachtet man nämlich die Farbstoffspeicherung in ihren ersten Anfängen, so erkennt man deutlich, daß es vor allem die Randzellen des hinteren Teiles der Kieme sind, die die ersten Granula aufweisen, von welchen aus die Speicherung nach und nach auch auf die innen liegenden Zellen und den vorderen Rand übergreift.

Diese Erscheinung tritt ganz analog auch wieder zutage beim Auftreten der ersten Mischgranula und später noch einmal bei der Bildung der Vakuolen. Ob dieses Phänomen durch irgendwelche physiologischen

Unterschiede der Zelle bedingt sein kann, konnte nicht näher untersucht werden.

Nr. 8: Methylenblau 2. Auch in diesem Mengenverhältnis treten nach einigen Stunden „staubfeine" Granula auf, und obschon Neutralrot quantitativ weit überwiegt, sind die blauen Granula doch noch sehr zahlreich vor allem in der 4. und 5. Kieme vorhanden. Im Prinzip ist der Speicherungsbeginn und der weitere Verlauf derselben gleich wie im vorhergehenden Mengenverhältnis. Auch hier beginnt die Granulabildung vom hinteren Rande her. Rote und blaue Farbstoffablagerungen sind auch hier wieder vermengt, und die Bildung der tropfenförmigen Granula geht auf die gleiche Art und Weise vor sich wie im Verhältnis 7 : 3.

Nach weiteren Stunden sind die ersten Mischgranula zu erkennen, welche anfangs nur in der 5. Kieme, später auch in den übrigen 4 auftreten. Zahl und Regelmäßigkeit ihres Erscheinens bleiben allerdings hinter derjenigen der Lösung 7 : 3 zurück. Auch kommt es wesentlich später und weniger intensiv zur Vakuolenbildung, die, wenn sie schon einsetzt, auch wieder in der 5. Kieme beginnt.

c) *Moldauwasser.*

Infolge der längere Zeit dauernden Trockenheit wurde dem Prager Leitungswasser filtriertes Moldauwasser beigegeben. So war mir Gelegenheit geboten, auch dieses Lösungsmittel auf seine Eignung für Vitalfärbungsversuche zu prüfen. Wie mit Leitungs- und destilliertem Wasser wurden die Lösungsverhältnisse auch mit Moldauwasser hergestellt. Die Tiere hielten sich sehr gut sowohl im Kulturmedium wie auch in den Farbstofflösungen.

Weniger günstig waren hingegen die Resultate, denn *mit Moldauwasser war es in keiner Versuchsserie möglich, weder eine normal verlaufende Farbstoffspeicherung noch ein typisches Färbungsbild der Kiemen zu erhalten.* In vereinzelten Fällen und nur höchst unregelmäßig kam es zur Bildung von Mischgranula.

Aus sämtlichen Versuchsserien ging eindeutig hervor, daß das Moldauwasser einer normalen Farbstoffspeicherung hemmend entgegenwirkt. Wie ich durch briefliche Mitteilung von Dr. Gicklhorn erfahren habe, soll das mit Moldauwasser vermischte Leitungswasser zur Zeit meiner Fehlversuche *chloriert* gewesen sein. Es läßt sich nicht entscheiden, ob für dieses Fehlresultat der starke Fe-Gehalt des Moldauwassers oder das beigegebene Chlor oder eventuell beide zusammen verantwortlich zu machen sind oder ob letzten Endes ganz andere unbekannte Milieufaktoren mitspielen. Experimentelle Versuche in dieser Richtung dürften gewiß der Sache näher kommen.

II. Verschiedene Reaktionszeit von Methylenblau und Neutralrot.

Die Versuchsserien mit destilliertem Wasser, ganz besonders aber die Untersuchungen im Leitungswasser, ließen eindeutig erkennen, daß Methylenblau und Neutralrot zwar gleichsinnig färben, daß diese beiden Farbstoffe in ihren einzelnen Phasen der Farbstoffaufnahme und Farbstoffspeicherung jedoch sehr stark divergieren. Muß es in der aktiven Zelle zur Bildung von Mischgranula kommen, so müssen die verwendeten Farbstoffe unbedingt in einem gewissen Gleichgewicht zueinander stehen, d. h. die die Speicherung bedingenden Faktoren müssen sowohl zeitlich wie graduell ausgeglichen sein, damit nicht die Dominanz des einen Farbstoffes den anderen an der Speicherung hindert oder ihn sogar vollständig übertönt, wie dies in den verschiedenen Mischungsverhältnissen deutlich zum Vorschein kommt.

Zur selben Zeit erschien nun die Arbeit von Nistler, welcher eine Methode ausgearbeitet hat, die es erlaubt, den Dispersitätsgrad von Farbstoffen zu bestimmen. Durch Verlegung der freien Diffusion ins mikroskopische Feld ist es möglich, mittels Schnellkolorimetrie innerhalb kürzester Zeit und bei konstanten Bedingungen eine große Zahl von Messungen auszuführen. Durch die Messungen werden wir nicht nur in den Stand versetzt, einen Farbstoff in Bezug auf Teilchengröße und Diffusionskoeffizient zu charakterisieren, sondern sie ermöglichen auch quantitativ festzulegen, inwieweit die einzelnen Farbstoffe „stabil" oder „labil" sind, „wieviel ihre Lebensdauer beträgt, in welchem Sinne ihre Reifungs- bzw. Alterungskurve verläuft".

Auf die Methode dieser Untersuchungen, die nicht nur für den mit Vitalfärbung sich beschäftigenden Biologen, sondern auch für den auf Permeabilitätsstudien eingestellten Physiologen von Bedeutung sind, kann ich hier nicht näher eingehen und verweise auf die Originalarbeit.

Nach diesen eingehenden Untersuchungen Nistlers war es wünschenswert, die Farbstoffe Methylenblau und Neutralrot unter Beobachtung ihrer Teilchengröße auf ihr Speicherungsvermögen bzw. ihre Permeierfähigkeit zu untersuchen.

Für diese beiden Farbstoffe ergeben sich nach Nistler folgende Anhaltspunkte:

Teilchenradien (a. 10^8) in Abhängigkeit von der Konzentration.

	Farbstoff	0,125 %	0,062 %	0,031 %	0,016 %	0,008 %	0,004 %	0,002 %
1	Methylenblau	13,5	9,2	6,7	5,4	4,6	4,1	3,5
2	Neutralrot bis 1 Tag .	7,4	5,9	5,6	5,2	5,4	5,2	—
3	Neutralrot 1 Jahr . .	5,4	5,1	4,6	4,3	—	3,6	—

Ausgehend von einer 0,125%igen Stammlösung wurden in destilliertem Wasser die entsprechenden Konzentrationsgrade hergestellt. (Die Werte von NISTLER sind für destilliertes Wasser berechnet.) Da mir keine alte Neutralrotlösung zur Verfügung stand, wurden die Beobachtungen nur an frischbereiteten Methylenblau- und Neutralrotlösungen gemacht. Wie aus der Tabelle deutlich hervorgeht, gehört Neutralrot zu den labilen Farbstoffen, indem es durch den Alterungsprozeß eine Verfeinerung der Teilchengröße erfährt. Da sich die konzentrierteren Lösungen infolge ihrer Giftigkeit ungünstig erwiesen, wurden die Versuche mehr auf die niederen Werte der Tabelle beschränkt.

a) Methylenblau.

Frisches Material kommt in Lösungen von folgenden Konzentrationen:

Zeit in Stunden	0,008 %	0,004 %	0,002 %	0,001 %	0,0005 %	0,00025 %	0,00012 %	0,00006 %
1/4	+							
1/2	+	+						
3/4			+					
1	++	+	+	+				
1,5	++	++		+	+	+		
2	+++	++		+	+			
3	+++	++	++	++	+	+	+	
5	+++				++		+	
12	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+

+ Beginn der Farbstoffspeicherung; ++ Tropfenförmige Granula; +++ Sättigung der Granula.

Die vorliegenden Werte, die ein Durchschnittsbild der Methylenblauspeicherung darstellen sollen, geben einen deutlichen Beweis der Abhängigkeit der Farbstoffspeicherung von der Konzentration der Lösung. Welche Bedeutung der Teilchengröße bei diesem Prozeß zukommt, soll hier nicht weiter erörtert werden, da diesbezügliche Untersuchungen vor dem Abschluß stehen.

Diese Versuche sollen vielmehr zeigen, ob Neutralrot- und Methylenblaulösungen von gleicher Teilchengröße in derselben Zeit von der Zelle gespeichert werden, oder ob es eine Eigentümlichkeit des Methylenblaus ist, rascher von der Zelle aufgenommen zu werden als andere Farbstoffe. In analoger Weise wurde daher auch Neutralrot auf seine Reaktionszeit untersucht.

b) Neutralrot.

Im Prinzip sehen wir bei Neutralrot das gleiche Bild wie bei Methylenblau. Der wesentliche Unterschied besteht darin, daß der ganze Speicherungsprozeß zeitlich verschoben ist, sowohl in Bezug auf beginnende Fär-

bung, wie auf Speicherungsintensität zugunsten des *Methylenblaus, das also in der Doppelfärbung einen deutlichen Vorsprung gegenüber dem Neutralrot besitzt, wenn derselbe nicht durch Verminderung der Konzentration experimentell ausgeschaltet wird.*

Frisches Material kommt in Lösungen von folgenden Konzentrationen:

Zeit in Stunden	0,008 %	0,004 %	0,002 %	0,001 %	0,0005 %	0,00025 %	0,00012 %	0,00006 %
1/4	–							
1/2	+							
3/4		+						
1	+	+						
1,5			+					
2		+	+	+				
3	+ +	+ +		+	+			
5			+ +		+		+	
12	+ + +	+ + +	+ +	+ +	+ +	+		+

Bezeichnung wie in vorhergehender Tabelle.

J. Beeinflussung der beiden Farbstoffe in Bezug auf ihre Speicherung.

In all diesen Versuchen zeigte sich nicht nur ein verschiedenes zeitliches Verhalten von Methylenblau und Neutralrot gesondert, sondern auch das *Gemisch* dieser beiden Farbstoffe nahm eine Sonderstellung ein. Da sich diese Erscheinung vor allem in den Mischungen bemerkbar machte, die als Kontrollversuche für die Granulaentstehung gedacht waren, wurde dieses Phänomen auch in den entsprechenden Mengenverhältnissen untersucht und zu diesem Zwecke folgende Versuchsanordnung getroffen:

	A		B		C	
a	7 Nr.	3 Wasser	7 Nr.	3 Mbl.	7 Wasser	3 Mbl.
b	8 „	2 „	8 „	2 „	8 „	2 „
c	9 „	1 „	9 „	1 „	9 „	1 „

Während Gruppe A und C die einzelnen Mengen der Methylenblau- bzw. Neutralrotlösung darstellen, bedeutet Gruppe B das Gemisch derselben.

Sämtliche Versuche wurden im Leitungswasser ausgeführt. Die folgenden Angaben stellen Mittelwerte aus mehreren Messungen dar, die gleichzeitig als Überprüfung früherer Versuche gedacht waren.

Var. a. Nach 2 Stunden zeigen Gruppe A und C noch keine Färbung, während in Gruppe B staubfeine blaue Granula zu erkennen sind. Selbst

nach 4 Stunden sind die Tiere in A noch ungefärbt, während B schon feine rote und stärker gefärbte blaue Granula aufweist; in C dagegen ist das Auftreten vereinzelter blauer Granula schon deutlich zu erkennen. Nach 6 Stunden zeigen sich auch in A die ersten roten Granula, während diejenigen in C an Intensität beträchtlich zugenommen haben. Gruppe B zeigt nun deutlich gefärbte blaue und schwächer gefärbte rote Granula, dazwischen vereinzelt, besonders in der 5. Kieme, auch Mischgranula.

Var. b. Während nach 2 Stunden A und C noch keine Färbung aufweisen, sind in B die ersten staubfeinen blauen Granula zu erkennen. Nach 3 Stunden erst werden in B auch rote Granula sichtbar. Während nach 4 Stunden in B rote und blaue Granula ungefähr gleich intensiv gefärbt erscheinen, treten in A und C staubfeine Farbstoffablagerungen auf. Dieselben werden erst nach 6 Stunden intensiver gefärbt, nach welcher Zeit auch die Tiere in B beträchtlich an Farbintensität zugenommen haben. Erst nach 8 Stunden treten in B Mischgranula auf.

Var. c. Nach Ablauf von 2 Stunden sind die Tiere in sämtlichen Lösungen noch farblos. Erst nach 3 Stunden sind in B feine rote Granula zu erkennen, während A und C immer noch ungefärbt erscheinen. In A treten staubfeine Farbstoffgebilde erst nach 4 Stunden auf, nach welcher Zeit sich in B neben stärker gefärbten roten, feine blaue Granula zeigen. C weist noch immer keine Färbung auf, dieselbe tritt erst nach 6 Stunden in ihren Anfangsstadien in Erscheinung.

Diese Beobachtungen lassen erneut erkennen, daß Methylenblau im Prozeß der Farbspeicherung bei Farbstoffkombinationen eine nicht zu unterschätzende Rolle spielt. Reines Methylenblau färbt rascher als reines Neutralrot entsprechender Konzentration. Andererseits zeigt sich aber auch recht deutlich, daß ein Gemisch dieser beiden Farbstoffe, wobei Methylenblau nur in geringer Menge vorhanden zu sein braucht, viel rascher in seinen Komponenten gespeichert wird, als diese selbst, wenn sie allein wirken. Eine solche Erscheinung ist vorläufig schwer zu deuten. Sie zeigt jedoch, daß der ganze Vorgang der Farbstoffspeicherung ein Prozeß von recht komplexer Natur ist und von Fall zu Fall studiert werden muß.

Während diesen Versuchsserien wurde vor allem in den verdünnten Lösungen des Methylenblaus (Gruppe C) eine Beobachtung gemacht, die mir für die Erklärung der Granulabildung von ausschlaggebender Bedeutung zu sein scheint.

In diesen Lösungen fanden sich mit ziemlicher Häufigkeit Individuen, bei denen die Farbstoffspeicherung auf ganz andere Zellen verteilt war als es sonst normalerweise der Fall war. Während bis jetzt durchwegs die „Netzlücken" den Farbstoff speicherten (Neutralrot sowohl wie Methylenblau), abgesehen von vereinzelten auch in den „Netzmaschen" gelegenen Granulis, waren es jetzt die „Netzmaschen", die eine reine Me-

thylenblaufärbung aufwiesen; die „Netzlücken" waren ganz frei von Farbstoff, wie aus folgender Abbildung deutlich hervorgeht (Abb. 4). Doch noch weit interessanter als die Verschiebung des Speicherungsortes waren die Farbstoffgebilde.

Diesmal sind es nicht mehr staubfeine Farbstoffablagerungen, kleine Farbstoffkugelchen (destilliertes Wasser), sondern diese Gebilde erwecken den Eindruck von kurzen stäbchenförmigen Inhaltskörpern der Zelle.

Um die Entstehung dieser Speicherungsformen genauer verfolgen zu können, wurden einige Versuchsserien von entsprechender Verdünnung aufgestellt und die Farbstoffspeicherung in ihren einzelnen Phasen unter dem Mikroskop verfolgt.

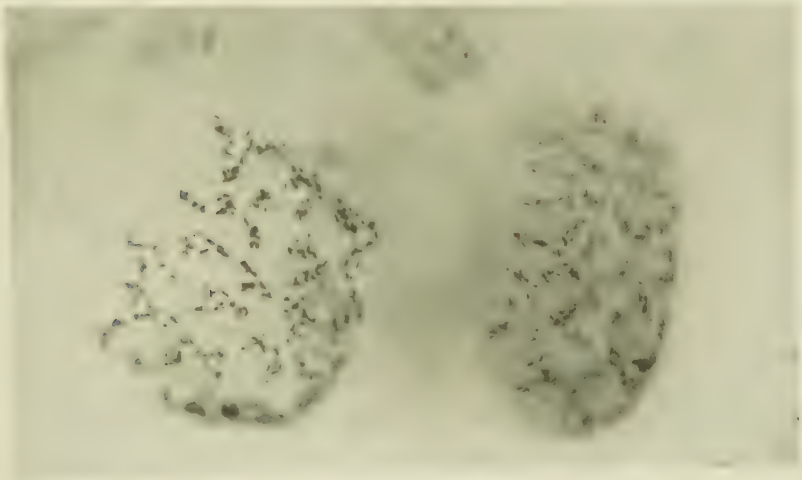

Abb. 4. Gegenbild zu Abb. 3. Netzmaschen als Oxydationsorte. Die Netzlücken heben sich farblos ab. Kurze stäbchenförmige Gebilde, die nicht koagulieren.

Infolge der äußerst schwachen Konzentration treten die ersten Farbstoffgebilde erst nach einigen Stunden auf, und zwar nicht in Form von feinen Pünktchen wie bis dahin, sondern gleich in der vollen Ausdehnung dieser eben erwähnten Gebilde. Zuerst ziemlich farbschwach, werden sie bei weiterem Farbstoffangebot nach und nach intensiver gefärbt, und dieses nun einmal entstandene Bild der Farbstoffablagerung bleibt meistens erhalten bis die Tiere absterben.

Anders verhält es sich, wenn das Farbstoffangebot in stärkerer Konzentration erfolgt, was zur Folge hat, daß diese Gebilde schon in kurzer Zeit intensiv gefärbt werden. Wie bei den staubfeinen Gebilden in den Netzlücken kommt es auch hier zu einer Verschmelzung der einzelnen Teile, die sich weniger in der Bildung von tropfenförmigen Granula eventuell von Vakuolen äußert, sondern vielmehr tritt in diesen Lösungen

eine Diffusfärbung ein, die auch erzielt werden kann, wenn in schwächeren Konzentrationen der Farbstoff längere Zeit auf die Tiere einwirkt.

Nach diesen überraschenden Ergebnissen war es wünschenswert, dieses Material, das ziemlich regelmäßig die eben erwähnte Erscheinung zeigte, auch in Farbstoffgemischen zu untersuchen. Gestützt auf die bereits in früheren Versuchen gemachten Erfahrungen und Beobachtungen wurden nur Lösungen von Nr. 7: Methylenblau 3 und Nr. 8: Methylenblau 2 verwendet und es zeigte sich recht bald, daß vor allem letztere Kombination für diesen Effekt besonders günstige Resultate liefert. Die folgenden Untersuchungen wurden daher in Mischungen von Nr. 8: Methylenblau 2 in Leitungswasser ausgeführt.

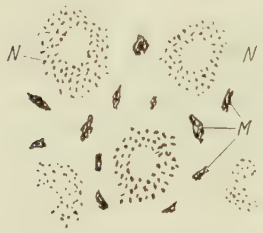

Abb. 5. Mosaikfärbung. *M* = Methylenblaugranula in den Netzmaschen. *N* = Neutralrotgranula in den Netzlücken.

Von besonderem Interesse war es zu erfahren, wie bei diesen Tieren das Neutralrot gespeichert wird. Entsprechend den gemachten Beobachtungen ließ sich erwarten, daß das Neutralrot auch in den Netzmaschen abgelagert und dort mit Methylenblau Mischgranula bilden würde.

Die Tiere, die in einer grünen Lösung (Neutralrot und Methylenblau) leben, zeigen schon nach wenigen Stunden eine wunderbare Mosaikstruktur, indem das Neutralrot in feinen Punkten nur die Netzlücken, Methylenblau dagegen in den stäbchenförmigen Gebilden nur die Netzmaschen färbt (Abb. 5). Mischgranula sind *keine* zu finden. Dieses Bild der ersten Phase der Farbstoffspeicherung bleibt längere Zeit bestehen. Nach einigen Stunden kommt es jedoch in den Netzlücken zur Bildung von tropfenartigen Granulis, die nach und nach auch in Vakuolen übergehen. Die Gebilde in den Netzmaschen sind beständiger und bewahren ihre Form auch weiterhin. Werden diese so veränderten Tiere noch längere Zeit in der Farbstofflösung gehalten, tritt folgende Erscheinung ein:

Abb. 6. Randfällungen in den Vakuolen. *M.* = Methylenblaugranula in den Netzlücken. *V.F.* = violette *Farb*stoffgebilde in den Vakuolen.

Der rote Inhalt der Vakuole färbt sich nach und nach violett und es kommt in ihr zu einer intensiveren Farbstoffspeicherung. Doch bald tritt auch hier die bereits erwähnte Erscheinung auf: der Farbstoff fällt aus und lagert sich in den Vakuolen randständig. Diese Farbstoffgebilde sind meistens rot, selten violett, während blaue nie beobachtet wurden. Aus-

geschlossen wäre diese Erscheinung jedoch nicht (Abb. 6). Sie kommt wohl deshalb nicht zustande, weil das Methylenblau der Lösung zum größten Teil schon in den Netzmaschen gespeichert ist. *Immerhin ist sehr bemerkenswert, daß vom Momente der Vakuolenbildung an das Methylenblau auch in dieselbe diffundiert.*

Diese Mosaikfärbung gelingt besonders hübsch bei jüngeren Individuen und ist besonders kontrastreich ausgeprägt in der 3. und 4. Kieme.

K. Ergebnisse und Diskussion.

Im folgenden möchte ich meine Beobachtungen mit den Ergebnissen anderer Forscher vergleichen und Erklärungsversuche für die betreffenden Erscheinungen zur Diskussion stellen.

Die Untersuchungen, welche die von FISCHEL postulierte Spezifität der Granula überprüfen sollten, haben eindeutig ergeben, daß Mischgranula im Speicherungsprozeß der Vitalfarbstoffe entstehen können, daß sie aber nicht unter allen Umständen auftreten müssen. v. MÖLLENDORFF, der hauptsächlich supravital Natur und Genese der Granula untersucht hat, glaubt, es handle sich bei diesen spezfischen Wirkungen des Farbstoffes um rein vitale Erscheinungen.

Wenn es FISCHEL nicht gelungen ist, bei Anwendung von Methylenblau und Neutralrot Mischgranula zu erhalten, so liegt das lediglich in seiner Versuchsanordnung begründet, von der er glaubte, daß sie für den Enderfolg belanglos sei.

Von der experimentell als günstig ermittelten Farbstofflösung ausgehend, habe ich die Wirkung der Farbstoffe zuerst im Succedanversuch überprüft. In diesen Versuchsserien hat sich gezeigt, daß Mischgranula nur auftreten, wenn die Tiere im Neutralrot vorgefärbt und nachher in Methylenblaulösungen übertragen werden. Schlägt man den umgekehrten Weg ein, so bleibt diese Erscheinung vollständig aus; es kommt nur noch zur Bildung von roten Granula neben den vorher entstandenen blauen.

Diese Erscheinung wird begreiflich, wenn man bedenkt, daß Methylenblau zum Kiemenepithel eine auffallende „Affinität" besitzt, was sich nicht in einer spezifischen Färbung derselben äußert, sondern lediglich in der Reaktionszeit ihren Ausdruck findet. Anders verhält es sich mit dem übrigen Körpergewebe. Übereinstimmend haben sämtliche Autoren, die sich mit Doppel- und Mehrfachfärbungen beschäftigt haben, festgestellt, daß Neutralrot im lebenden Protoplasma schneller sichtbar, also gespeichert wird, als Methylenblau. GARMUS (1912), der vor allem an der Nickhaut der Frösche solche Versuche anstellte, fand, daß in den Drüsenzellen Neutralrot schneller sichtbar wird als Methylenblau. Denselben Befund konnte ich an der Speicheldrüse von *Daphnia magna* fest-

stellen, die in einer Lösung von Neutralrot 1 : Methylenblau 9 rot gefärbt wird.

Der deutliche Vorsprung des Methylenblaus in den Kiemen dürfte wohl dadurch zustande kommen, daß die letzteren, als hauptsächlich oxydierend-reduzierende Organe, zu Methylenblau, einem typischen Küpenfarbstoff, besondere Affinität aufweisen. Ohne den Gründen dieses Verhaltens nachzugehen, hat Fischel auf ein spezifisches selektives Vermögen der sich färbenden Gebilde geschlossen. Er hat dabei aber außer acht gelassen, daß bestimmte Eigenschaften des Organismus oder mehr oder weniger genau definierbare Funktionen der Zelle die Farbstoff-*speicherung* weitgehend beeinflussen können, so daß es oft deshalb nicht zu einer gleichartigen Wirkung der Farbstoffe kommen kann. Mitrophanow und Ehrlich konnten besonders von Methylenblau feststellen, daß es hauptsächlich an solchen Stellen gespeichert wird, wo ein intensiver Stoffwechsel stattfindet, und v. Möllendorff schließt auf Orte von ausgeprägter O_2-Sättigung. Gewiß unterliegt es keinem Zweifel, daß diese beiden Annahmen für die Kiemen restlos zutreffen. Es würde sich in diesem Falle also nicht um eine Spezifität vorgebildeter Granula handeln, sondern diese Erscheinung beruht vielmehr auf den charakteristischen Bedingungen der Farbstoffspeicherung im Plasma.

Von dieser Erkenntnis ausgehend, läßt sich denn auch leicht erklären, weshalb Mischgranula nur bei bestimmter Reihenfolge der Farbstoffverabreichung entstehen können. Kommen die Tiere zuerst in Methylenblau und werden erst nach kräftiger Farbstoffspeicherung in Neutralrot übertragen, so kann es wohl deshalb nicht mehr zur Bildung von violetten Granulis kommen, weil die Zellen schon mit Farbstoff gesättigt sind, ein Gleichgewicht zwischen Granula und Farblösung schon besteht. Umgekehrt ist anzunehmen, daß in derselben Zeit Neutralrot noch nicht vollständig gespeichert ist, daß infolgedessen das ohnehin schon durch rasche Speicherung ausgezeichnete Methylenblau noch in die roten, tropfenförmigen Granulis einbezogen werden kann, und so den Eindruck des Mischgranulums erweckt.

Da jedoch in diesem Stadium der Farbstoffspeicherung das Eindringen des zweiten Farbstoffes in die tropfenförmigen Granula recht erschwert ist, infolge des nahezu stabilen Gleichgewichtes, sind wir nicht berechtigt, auf Grund dieser Beobachtungen allein auf die Tatsache der Bildung von Mischgranula zu schließen. Es wurden daher weitere Versuchsserien aufgestellt, um die simultane Farbstoffverabreichung in ihren Phasen der Speicherung zu beobachten, die auch die Entstehung dieser violetten Gebilde in ihren Anfangsstadien zeigen sollte. Wenn es in diesen Versuchslösungen nur bei ganz bestimmten Mengenverhältnissen zur Bildung von Mischgranula kommt, so liegt darin wieder ein deutlicher Beweis für die ungleiche Wirkung von Neutralrot und Methylenblau. Wenn die meisten

Versuche bislang fehlschlugen, so liegt der Grund wohl darin, daß die betreffenden Autoren diese beiden Farbstoffe im Verhältnis 1 : 1 für ihre Untersuchungen verwendeten (Angaben über Mischungsverhältnisse der Farbstoffe sind in der Literatur meist weggelassen) und dabei als Resultat meist nur blaue, wenig rote und gar keine Mischgranula erhielten.

Ich habe daher diese beiden Farbstoffe in abgestufter Reihenfolge angewendet und gesehen, daß es nur dann zur Bildung dieser violetten Granula kommt, wenn die beiden verwendeten Farbstoffe so abgestimmt sind, daß Reaktionszeit und Speicherungsintensität nahezu gleich sind. Diese Maßnahme ließ sich durch Abstufen der Farbmengen sehr leicht bewerkstelligen und zeigte bei der Lösung Nr. 7: Methylenblau 3 fast nur violette Granula. Dadurch, daß wir Methylenblau in geringerer Quantität, mithin in verminderter Konzentration als Neutralrot verwenden, ist es möglich, diese beiden Farbstoffe zur selben Zeit in der Zelle erscheinen zu lassen und ihre Phasen der Speicherung zu gleicher Zeit beobachten zu können. Wenn wir nach einiger Zeit feststellen müssen, daß diese Gebilde in den einzelnen Kiemen verschieden zahlreich auftreten, so liegt dies keinenfalls an einer besonderen Befähigung der Zelle, sondern es handelt sich hier lediglich um eine auffällige organspezifische Speicherung des Methylenblaus. Diesbezügliche Untersuchungen in reinen Methylenblaulösungen zeigten deutlich eine überwiegende Farbspeicherung in der 5. Kieme, die nach vorn mehr und mehr abgeschwächt wird.

Das verschieden intensive Anfarben der einzelnen Kiemen dürfte mithin der Ausdruck einer ungleich gestalteten Zellfunktion sein und auf Grund der gemachten Beobachtungen kann man darin ein schönes Beispiel dafür sehen, daß trotz fehlender auffallender morphologischer Unterschiede zwischen Organen gleicher Funktion doch noch feinere Abstufungen vorhanden sind, die bisher bloß mit Hilfe vitaler Färbung aufgedeckt werden konnten.

Diese Annahme scheint um so eher berechtigt als die Methylenblaugranula zuerst in der 5. Kieme zu beobachten sind. Auf ähnliche Weise können wir wohl auch die Tatsache erklären, daß der hintere Rand jeder einzelnen Kieme offenbar infolge der bestimmt gerichteten Bewegung der Epipodite zuerst Farbstoffspeicherung aufweist. Da wir nun aber gesehen haben, daß zur Bildung von Mischgranula die beiden Farbstoffe nahezu in gleicher Quantität gespeichert werden müssen, ist eine gewisse Unregelmäßigkeit oder sogar das Ausbleiben dieser Gebilde wohl verständlich.

Ich habe bis jetzt meist von tropfenförmigen Gebilden gesprochen, die in der Literatur allgemein unter dem Namen „Granula" zusammengefaßt werden und möchte nun auf die Entstehung dieser Produkte, mithin auf den Prozeß der Speicherung näher eingehen. Dabei möchte ich

vorerst ganz absehen von den verschiedenen daran beteiligten Faktoren und Eigenschaften der Zelle und des Farbstoffes, sondern lediglich die verschiedenen Phasen der Speicherung, so wie ich sie unter dem Mikroskop beobachten konnte, kritisch beleuchten. Ich möchte daher nochmals auf Abb. 1 verweisen, in der die charakteristische Lagerung und Anordnung der kurzen stäbchenförmigen Gebilde deutlich zum Vorschein kommt.

Wie aus meinen Versuchsprotokollen ersichtlich ist, treten zuerst staubfeine Körnchen auf. Da am lebenden Objekt eine morphologische Differenzierung der einzelnen Zellen der Kieme nicht zu erkennen ist, auch nicht mit stärkster Vergrößerung, läßt sich für diese Beobachtung nicht entscheiden, ob es sich in diesen Gebilden um Färbung *präformierter* Bestandteile der Zelle handelt oder ob es willkürlich angeordnete, durch das Plasma ausgeschiedene Farbstoffkörnchen sind.

Die Richtigkeit der v. Möllendorffschen Theorie, daß basische Farbstoffe in der Regel nur präformierte Gebilde färben, vorausgesetzt, wäre anzunehmen, daß es sich in diesen feinen Körnchen um die Färbung jener auch im fixierten Material erkennbaren Strukturen handelt. Verfolgen wir den Speicherungsprozeß weiter, so bemerken wir bald, daß diese meist formverschiedenen Körnchen runde tropfenartige Gestalt annehmen, die durch Verschmelzen der einzelnen Körnchen zustande kommen, wodurch auch alle möglichen Größen entstehen. Diese aus feinen Gebilden entstandenen Konglomerate bezeichnet man heute schlechthin als „Granula". Dabei hat man sich aber zu erinnern, daß es sich in diesen Formgebilden nicht um gefärbte Strukturelemente der Zelle handelt: *diese mit basischen Farbstoffen darstellbaren tropfenartigen Gebilde sind nicht präformiert, es sind ebenso reine Kunstprodukte wie die sogenannten sauren Vitalgranula.* Damit soll jedoch über die Entstehungsbedingungen nichts weiter ausgesagt werden. Wenn v. Möllendorff annimmt, daß der von der lebenden Zelle nicht zersetzte Farbstoff in ein Milieu komme, in dem vakuolär angeordnete saure Substanzen verteilt seien (Granula), die er zu färben imstande sei, vorausgesetzt, daß der Farbstoff ein Fällungsvermögen für saure Substanzen besitzt, so sind ihm wohl die ersten Phasen der Farbstoffspeicherung entgangen oder es handelt sich in seinen Beobachtungen um ganz andere Versuchsbedingungen. Diese staubfeine Verteilung des Farbstoffes, die auch Garms (1912) an den Nickhautdrüsen des Frosches beobachtet hat, läßt sich ungleich schwerer bei Lösungen in destilliertem Wasser verfolgen und bei konzentrierten Lösungen ist es ganz ausgeschlossen, diese beginnende Farbstoffablagerung zu beobachten.

Die Zahl dieser runden Granula ist enorm *schwankend*, was wiederum dafür spricht, *daß diese Gebilde nicht präformiert sein können.* Die kleineren werden nach und nach größer und verschmelzen mit anderen.

Dieser Prozeß kann sogar soweit führen, daß letzten Endes nur noch ein Granulum die Zelle erfüllt, eine Vakuole oder Vesikel im Sinne Nagels.

Dabei ist vor allem auffallend, daß diese runden Granula konzentrisch um den Zellkern angeordnet sind, in der Randzone der Zellen sogar oft fehlen.

Bei längerem Betrachten dieser Gebilde kommt man zur Annahme, daß diese Farbstoffkugeln der Ausdruck der lebenden funktionstüchtigen Zelle sind und ihre Entstehung einer *protoplasmatischen* Entmischung sehr nahe stehen dürfte. Von der Annahme ausgehend, daß die physikalisch-chemischen Bedingungen in einer Zelle in der Nähe des Zellkernes andere als in der Randpartie sein dürften, wäre auch ihre Anordnung um denselben erklärt.

Ganz ähnliche Befunde hat auch Nagel an in vitro gezüchteten Kaninchenfibrozyten erhalten. Wenn auch ganz auf der v. Möllendorff-schen Theorie aufbauend, gibt er doch zu[1], *daß in den mit Neutralrot gefärbten Zellen eine Vermehrung der gefärbten Vakuolen unverkennbar ist*, die er folgendermaßen charakterisiert. „Die neben den Vakuolen im Beginne der Färbung sehr häufig noch auftretenden kleineren und kleinsten granulären Einschlüsse können sich wahrscheinlich zu großen Farbvakuolen ausdehnen, da sie bei den Endstadien der Neutralrotablagerung nicht mehr so zahlreich beobachtet werden können. Dies dürfte aber die einzige Möglichkeit sein, durch welche es zu einer Vermehrung der Orte der Farbablagerung gegenüber den schon vorhandenen präformierten Vakuolen kommen kann."

Daraus geht ebenso deutlich hervor, daß die präformierten Gebilde, seien es nun Fettkugeln oder andere granuläre Einschlüsse, diejenigen Stellen darstellen, an denen es zu einer Farbspeicherung kommt. Durch vermehrte Farbstoffzufuhr entstehen daraus durch sekretorische Prozesse des Cytoplasmas kugelige Gebilde, Farbstoffvakuolen, die den Farbstoff in gelöster Form enthalten. Diese so entstandenen Gebilde können also auch hier nicht in ihrer letzten Form präformiert sein — sonst müßten ja auch die übrigen ungefärbten Einschlüsse alle Kugelform aufweisen, sondern sind vielmehr Produkte des Zellstoffwechsels, unter den veränderten Bedingungen in der Zelle neu entstandene Gebilde.

Nach all diesen Feststellungen scheint die Annahme Chlopins, daß die Vitalgranula vielfach neu entstandene Gebilde sind, berechtigt zu sein. Weniger glaubhaft scheint mir hingegen die Vorstellung der Speicherung von der er annimmt, daß sie nicht durch Adsorption des Farbstoffes an präformierte Strukturgebilde zustande komme, sondern durch Abscheidung von Stoffen, die vom umliegenden Cytoplasma sezerniert werden.

[1] Von mir ausgezeichnet.

Ich glaube, durch meine Beobachtungen auch diese Frage teilweise klären zu können. Wie bereits erwähnt, zeigten sich in meinen Versuchsserien mit einiger Regelmäßigkeit Individuen, bei denen sich die Kiemenzellen nicht wie üblich dem Methylenblau gegenüber verhielten (bei Neutralrot trat diese Erscheinung nie auf), sondern gerade entgegengesetzt. Mit Methylenblau konnten nur die Netzmaschen, die sonst reduzierend wirken, gefärbt werden, während die Netzlücken farblos blieben. Eine genaue Kontrolle der Farbstoffspeicherung zeigt deutlich, entsprechend der Abb. 1, die Anfärbung der kurzen stäbchenförmigen Gebilde. Anfänglich farbschwach werden sie nach und nach stärker gefärbt und lassen deutlich jene im fixierten Material (Fiedler) darstellbaren Gebilde erkennen. Auffallend ist nun die Tatsache, daß es in den Netzmaschen nicht zur Bildung von tropfenförmigen Granula oder Vakuolen kommt, denn wenn schon ein Verschmelzen eintritt, entsteht sofort die diffuse Färbung, was infolge der innigen Berührung dieser Gebilde wohl verständlich ist. Rückschließend auf die ersten Beobachtungen ist anzunehmen, daß wir in den staubfeinen Körnchen der Netzlücken genau die gleichen Gebilde angefärbt haben wie in den Netzmaschen; nur erscheinen sie dort infolge ihrer Lagerung als Punkte. Der Farbstoff konzentriert sich also viel eher an diesen Stellen als bei den parallel angeordneten Gebilden in den Netzmaschen, was auch bald eine Störung des Gleichgewichtes im umliegenden Plasma zur Folge hat, die sich in der Bildung der runden tropfenartigen Granula äußert.

Somit würde es sich also bei der Speicherung dieser Farbstoffe nicht um einen Ausscheidungsprozeß im Sinne Chlopins handeln, sondern um die Färbung in der Zelle vorhandener Gebilde, über die ich keine näheren Angaben machen kann. Ob es sich dabei um Mitochondrien oder andere interplasmatische Bestandteile handelt, möge dahingestellt bleiben. Wenn sich diese „geformten Inhaltskörper unbekannter chemischer Natur", von denen Gicklhorn u. Keller bisher die Unfärbbarkeit betonten, dennoch mit Methylenblau färben ließen, so liegt das an den hier erstmalig durchgeführten Serienversuchen.

Durch diese Beobachtungen ist es nun auch möglich, die Befunde Chlopins zu erklären, welcher feststellte, daß besonders durch den Einfluß des Neutralrots auf die Zelle neue gefärbte Gebilde auftreten können, für die er einen intrazellulären Sekretionsprozeß verantwortlich macht. Je nachdem Speicherungsstadium können diese Einflüsse verschieden beschaffen sein. „Auf fortgeschrittenen Speicherungsstadien enthalten die Speicherungseinschlüsse fast ausnahmslos größere oder kleinere Mengen von Substanzen, welche im fixierten Präparat vollkommen deutlich nachgewiesen werden können . . . und nach ihrem Verhalten den angewandten Reagenzien gegenüber als eiweißartige Substanzen angesprochen werden müssen"; diese Substanzen, die er als „Krinom" bezeichnet, „sind in

angespeicherten normalen Zellen weder im Bestande eventueller präformierter Zelleinschlüsse nachweisbar, noch sind sie an irgendeine als ‚Organoid' angesprochene Struktur geknüpft, müssen also, wenigstens in letzter Instanz, aus der lebenden Grundmasse des Zellprotoplasmas stammen".

Wenn also Chlopin in fixierten Präparaten, die mit Neutralrot vorbehandelt wurden, mehr Zelleinschlüsse entdeckt als in ungefärbten Kontrollpräparaten, sehe ich darin einen letzten Beweis der Annahme, daß die als Granula bezeichneten Gebilde Kunstprodukte in oben erwähntem Sinne des Zellstoffwechsels sind, wobei ich allerdings entgegen Chlopin *wenigstens für die von mir untersuchten Kiemen von Daphnia magna eine präformierte Grundlage voraussetze*. Ob diesem Sondervorfall allgemeine Bedeutung für die Färbung mit basischen Farbstoffen zukommt, müssen weitere Untersuchungen vorerst aufklären.

Es bleibt nun noch die Aufgabe, auf jene Vorgänge näher einzugehen, die sich alsdann in der Zelle abspielen, wenn einmal die ersten Granula gebildet sind. Wir haben gesehen, daß es bei reichlicher Farbstoffzufuhr schließlich zur Vakuolenbildung in der Zelle kommt. Diese enthält den Farbstoff in Lösung, ist vollkommen homogen gefärbt. Wird die Farbstoffzufuhr nicht unterbunden, so wird die Lösung in der Vakuole nach und nach konzentrierter und es kommt schließlich zur Fällung und Ausflockung des Farbstoffes, der sich randständig anordnet. In der weiteren Farbspeicherung haben wir einen analogen Vorgang vor uns, wie ihn die Überfärbung des sauren Vitalgranulums durch einen basischen Farbstoff darstellt. Die Fällung des Farbstoffes kann soweit getrieben werden, daß der Inhalt der Vakuole fast vollständig farblos erscheint. Die Entstehung der einzelnen Vakuolen braucht nicht unbedingt durch Koagulation der einzelnen Granula entstanden zu sein, es läßt sich vielmehr auch denken, daß, wie bei der Bildung der Mischgranula durch zwei saure Farbstoffe die Konzentration des vorgefärbten Granulums entscheiden dürfte, ob der zweite der Zelle dargebotene Farbstoff sich noch zumischen kann oder ob er anderswo abgelagert werden muß. Ein schönes Beispiel für diese Annahme zeigten die Versuche der *succedanen* Farbstoffverabreichung, in dem weniger intensiv gefärbte Neutralrotgranula Methylenblau noch aufnehmen konnten und Mischgranula bildeten, während die infolge ihrer größeren Affinität intensiver mit Farbstoff beladenen Methylenblaugranula das Neutralrot nicht mehr speichern konnten, bei welcher Versuchsanordnung es nie zur Bildung von Mischgranula kam.

Weniger erklärlich scheint mir der Vorgang zu sein, der besonders charakteristisch in der Lösung Nr. 8: Methylenblau 2 sich abspielte, in dem es hier zu einer Mosaikfärbung kam, wobei die Netzmaschen rein blau und die Netzlücken rein rot gefärbt waren.

Eine Verdrängung des Neutralrotes durch Methylenblau ist offensichtlich. Während in den Netzlücken staubfeine rote Körnchen zu sehen waren in den Anfangsstadien, waren es in den Netzmaschen die charakteristisch gelagerten, kurzen, stäbchenförmigen, blau gefärbten Gebilde.

Mit Neutralrot ist es mir nie gelungen, diese Gebilde in den Netzmaschen zu färben. Ob es sich hier um eine gegenseitige Beeinflussung, gewissermaßen Veränderung der einzelnen Farbstoffe handelt, scheint möglich zu sein, hat sich doch gezeigt, daß das Gemisch der beiden Farbstoffe rascher die einzelnen Komponenten zur Speicherung bringt als diese allein. Welch andere Veränderung entstanden sein könnte, läßt sich vorläufig nicht ersehen. Dies um so weniger als sich nach einiger Zeit zu den in den Netzlücken gebildeten roten Granula auch Methylenblau hinzumischte und schließlich deutlich violette Granula entstanden, in welchen jedoch Blau im Rückstand blieb und wenn es auch zu Randfällungen kam, waren es meist rote, selten violette Farbstofflocken.

Auf Grund dieser Beobachtungen ließe sich vielleicht denken, daß in den entstandenen Vakuolen hauptsächlich saure Eiweiße des umgebenden Protoplasmas sich konzentrieren würden, die dann nach einiger Zeit auch dem Methylenblau den Eintritt erlauben. So interessant diese Erscheinung auch ist, so herrscht doch noch Unklarheit über ihr Zustandekommen.

Daß für den ganzen Komplex der Farbstoffspeicherung die elektrochemischen Faktoren eine sehr große Rolle spielen, unterliegt keinem Zweifel mehr. Je nach dem Kulturmedium, das wir für unsere Versuchszwecke verwenden, wird auch das Bild der Farbstoffspeicherung verschieden ausfallen. Einen klaren Beweis hierfür gibt der Vergleich der Resultate aus Versuchsserien mit Leitungs- und destilliertem Wasser. Während in diesem Medium die staubfeinen Körnchen rasch in feine Kügelchen übergehen, sich also schon sehr früh mit Hilfe des Lösungsmediums abrunden, bleiben dieselben in jenem weit länger in ihrer charakteristischen Entstehungsform erhalten. Es untersteht gewiß keinem Zweifel, daß für diesen Unterschied besonders die Elektrolyte verantwortlich zu machen sind, die den Entmischungsprozeß des Protoplasmas hemmen oder beschleunigen können. Doch noch viel auffälliger zeigt sich die Bedeutung der Elektrolyte in den Versuchen mit Moldauwasser, indem es in diesem Lösungsmittel nicht mehr zu einer normalen Farbstoffspeicherung kommt. Wenn auch im allgemeinen ihre Wirksamkeit auf die Farbstoffe noch recht wenig bekannt ist, so darf heute doch angenommen werden, daß auf saure Farbstoffe besonders die *Kationen*, auf basische die *Anionen* wirksam sind.

L. Zusammenfassung.

Vorliegende Arbeit wurde in der Absicht unternommen, auf Grund verschiedenartiger Versuchsbedingungen mit Hilfe vitaler Doppelfärbungen an den Kiemen von *Daphnia magna* Müller Aufschluß zu erhalten über die von Fischel postulierte Spezifität des *basischen* Vitalgranulums zugleich die Genese desselben einer kritischen Beleuchtung zu unterziehen.

Die Versuche haben ergeben:

1. Es ist durchaus möglich, bei Doppelfärbungen mit Neutralrot und Methylenblau in den Netzlücken der Kiemen *Mischgranula* zu erhalten. Ihre Entstehung hängt im wesentlichen von der Anwendungsart der Farbstoffe ab.

2. Werden die Farbstoffe *simultan* verabreicht, so müssen die beiden Komponenten in einem Färbungsgleichgewicht stehen. Gelangen die Farbstoffe jedoch getrennt, *succedan*, zur Wirkung, so ist die Entstehung der Mischgranula in hohem Maße von der Speicherungsintensität des mit einem Farbstoff vorgefärbten Granulums abhängig.

3. Wie die ersten Speicherungsstadien deutlich zeigen, handelt es sich in den staubfeinen Farbstoffkörnchen um Färbung *präformierter* wohlcharakterisierter Gebilde des Cytoplasmas. Die aus diesen ersten Farbstoffablagerungen entstandenen, allgemein als „Granula" bezeichneten, späteren Färbungsprodukte verdanken ihre Entstehung zwar präformierten Gebilden, sind aber selbst *keine* präformierten Bestandteile des Zelleibes mehr, sondern durch tropfige Entmischung des Protoplasmas entstandene *Kunstprodukte*.

4. In geeigneten Verdünnungen ist es möglich, bei ungefärbt bleibenden Netzlücken, mit Methylenblau die sonst reduzierenden Netzmaschen zu färben, wodurch diese Verschiebung der oxydierenden und reduzierenden Zellen bedingt ist, kann vorläufig nicht erklärt werden.

5. Art und Weise der Entstehung sowie Zahl und Größe der Granula sind je nach dem Lösungsmedium des Farbstoffes verschieden. Ich führe diese Unterschiede vorläufig auf Elektrolytenwirkung zurück.

6. Messungen in Bezug auf Reaktionszeit der beiden Farbstoffe lassen eine ausgesprochene Affinität des Methylenblaus zum Respirationsepithel erkennen. Auf Grund der verschieden starken Farbstoffspeicherung ist es möglich, zellphysiologische Unterschiede in ein und demselben Organ aufzudecken.

7. Jede auch noch so kleine Zugabe von Methylenblau zu Neutralrotlösungen wirkt im Sinne einer *Beschleunigung* der Farbstoffspeicherung.

8. Bei reichlichem Farbstoffangebot kommt es in den Zellen sowohl durch Koagulation wie durch vermehrte Farbstoffaufnahme zur Va-

kuolenbildung, in welchen bei geeigneter Farbstoffkonzentration der Farbstoff ausflocken und randständig sich verteilen kann.

9. Unter ganz bestimmten Bedingungen ist es bei simultaner Farbstoffverabreichung möglich, die Speicherungsorte für Methylenblau und Neutralrot getrennt zu erhalten. Dabei färbt Methylenblau die Netzmaschen und Neutralrot die Netzlücken.

M. Literaturverzeichnis.

1. **Arnold, J.:** Plasmosomen, Granula usw. Anat. Anz. **31** (1907). — 2. Über Granulafärbung lebender und überlebender Gewebe. Virchows Arch. **159** (1900). — 3. Über Struktur und Architektur der Zellen. Arch. mikrosk. Anat. **52** (1898). — 4. Weitere Beobachtungen über vitale Granulafärbung. Anat. Anz. **16** (1899). — 5. **Bernecker, A.:** Zur Histologie der Respirationsorgane bei Crustaceen. Zool. Jb., Abt. Morph. u. Anat. **27** (1909). — 6. **Claus, C.:** Zur Kenntnis der Organisation und des feineren Baues der Daphniden usw. Z. Zool. **27** (1876). — 7. **Chlopin, N. G.:** Experimentelle Untersuchungen über die sekretorischen Prozesse im Zytoplasma. I. Arch. exper. Zellforschg **4** (1927). — 8. Experimentelle Untersuchungen über die Vitalfärbung tierischer Zellen. Ebenda **6** (1928). — 9. **Duesberg, J.:** Plastosomen, „Apparato reticolare interno" und Chromidialapparat. Erg. Anat. **20** (1912). — 10. **Evans, H.** u. **Schulemann, W.:** Die vitale Färbung mit sauren Farbstoffen in ihrer Bedeutung für pharmakol. Probleme. Dtsch. med. Wschr. **1914**, Nr 30. — 11. Über Natur und Genese der durch saure Farbstoffe entstehenden Vitalfärbungsgranula. Fol. haemat. (Lpz.) **19** (1915). — 12. **Fiedler, P.:** Mitteilungen über das Epithel der Kiemensäckchen von *Daphnia magna*. Zool. Anz. **33** (1908). — 13. **Fischel, A.:** Untersuchungen über vitale Färbung. Anat. H. **16** (1901). — 14. Untersuchungen über vitale Färbung an Süßwassertieren, insbesondere bei Cladoceren. Leipzig 1908. — 15. Vitale Färbung. In: Encyclop. d. mikrosk. Technik, 3. Aufl. 1926. — 16. **Fischer, A.:** Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas. Jena 1899. — 17. Zur Kritik der Fixierungsmethoden und der Granula. Anat. Anz. **9** (1894). — 18. **Fürth, R.:** Atomphysik und Elektrobiologie. Erg. Physiol. **27** (1928). — 19. **Garmus, A.:** Fortgesetzte Untersuchungen über die physiologische Permeabilität der Zellen. Z. Biol., N. F. **58** (1912). — 20. **Gellhorn, E.:** Studien zur vergleichenden Physiologie der Permeabilität. I., II. u. III. Mitt. Pflügers Arch. **216** (1927). — 21. Das Permeabilitätsproblem. Monographien Physiol. **16** (1929). — 22. **Gicklhorn, J.:** Beobachtungen über die vitale Farbstoffspeicherung. Kolloidchem. Beih. **28** (1929). — 23. **Gicklhorn, J.** u. **Keller, R.:** Bau und Funktion des „Haftorgans" von *Daphnia*. Zool. Anz. **64** (1925). — 24. Elektive Vitalfärbungen als histophysiologische Methode bei Wirbellosen. Arch. exper. Zellforschg **1** (1925). — 25. Neue Methoden der elektiven Vitalfärbung usw. Z. Zool. **127** (1926). — 26. Organspezifische Differenzierung des Tierkörpers durch elektive Vitalfärbungen. Biol. generalis (Wien) **2** (1926). — 27. Über elektive Vitalfärbungen der Kiemensäckchen von *Daphnia magna* Müller als Beispiel organ- und zellspez. Differenzierung. Z. Zellenlehre **2** (1925). — 28. **Giesbrecht, W.:** Crustacea. In: Lang, Handbuch der Morphologie der Wirbellosen **4** (1913). — 29. **Goldmann, E.:** Neue Untersuchungen über die innere und

äußere Sekretion im gesunden und kranken Organismus im Lichte der „vitalen" Färbung. Tübingen (1912). — 30. **Gurwitsch, A.:** Zur Morphologie der Nierentätigkeit. Pflügers Arch. **91** (1902). — 31. **Heidenhain, M.:** Plasma und Zelle. Jena 1907. — 32. **Herzfeld, E.:** Über die Natur der am lebenden Tier erhaltenen granulären Färbungen. Anat. H. **54** (1917). — 33. **Höber, R.:** Die Durchlässigkeit der Zellen für Farbstoffe. Biochem. Z. **20** (1909). — 34. Beitrag zur physikalischen Chemie der Vitalfärbung. Ebenda **67** (1914). — 35. **Höber, R. u. Nast, O.:** Weitere Beiträge zur Theorie der Vitalfärbung. Ebenda **50** (1913). — 36. **Kedrowsky, B.:** Die Stoffaufnahme bei *Opalina ranarum*. III. Mitt. Aufnahme und Speicherung von Farbstoffen. Z. Zellenlehre **12** (1931). — 37. **Keller, R.:** Die Elektrizität in der Zelle, 2. Aufl. 1925. — 38. Neue Methoden in der Mikro-Physiko-Chemie. Biochem. Z. **168** (1926). — 39. Die elektrische Charakteristik der Farbstoffkolloide Kolloid-Z. **26** (1916). — 40. **Kiyono, K.:** Die vitale Karminspeicherung. Jena 1914. — 41. Zur Frage der histiozytären Blutzellen. Fol. haemat. (Lpz.) **18** (1914). — 42. **Krause, R.:** Gibt es eine „vitale" Färbung? Anat. Anz. **24** (1904). — 43. **Leydig, Fr.:** Naturgeschichte der Daphniden. Tübingen 1860. — 44. **Loele:** Über vitale Granulafärbung mit sauren Farbstoffen. Fol. haemat. (Lpz.) **14** (1913). — 45. **Merker, E.:** Das Verhalten feuchthäutiger Tiere im Lichte. Zool. Anz. **57** (1924). — 46. **Metzner, P.:** Zur Kenntnis der photodynamischen Erscheinung. Biochem. Z. **148** (1924). — 47. **Meves, F.:** Zur Einigung zwischen Faden- und Granulalehre des Protoplasmas. Arch. mikrosk. Anat. **75** (1910). — 48. **Michaelis, L.:** Die vitale Färbung, eine Darstellungsmethode der Zellgranula. Ebenda **55** (1900). — 49. **Mitrophanow:** Über Zellgranulationen. Biol. Zbl. **9** (1889). — 50. **v. Möllendorff, W.:** Zur Morphologie der vitalen Granulafärbung. Arch. mikrosk. Anat. **90**, Abt. 1 (1918). — 51. Die Bedeutung von sauren Kolloiden und Lipoiden für die vitale Farbstoffbindung in den Zellen. Ebenda **90**, Abt. 1 (1918). — 52. Vitale Färbungen an tierischen Zellen. Erg. Physiol. **18** (1920). — 53. Vitale Färbungen an Tierzellen. In: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. 5, Teil 2. 1921. — 54. Die Speicherung saurer Farben im Tierkörper, ein physikalischer Vorgang. Kolloid-Z. **19** (1916). — 55. **Nagel, A.:** Untersuchungen über die Vitalfärbung in vitro gezüchteter Fibrozyten erwachsener Kaninchen. I. Versuche mit Neutralrot. Z. Zellenlehre **9** (1929). — 56. Untersuchungen über die Vitalfärbung in vitro gezüchteter Fibrozyten erwachsener Kaninchen. II. Die Beziehungen zwischen Fettablagerung und Deponierung von Neutralrot und Methylenblau. Ebenda **10** (1930). — 57. **Nirenstein, E.:** Über das Wesen der Vitalfärbung. Pflügers Arch. **179** (1920). — 58. **Nistler, L.:** Dispersitätsuntersuchungen an Farbstoffen. Kolloidchem. Beih. **31** (1930). — 59. **Pappenheim, A. u. Nakano:** Beiträge über Beziehungen zwischen Vitalfärbung, Supravitalfärbung und Oxydasereaktion. Fol. haemat. (Lpz.) **14** (1912). — 60. **Parat et Painlevé:** Sur l'exacte concordance des caractères du vacuome et de l'appareil de Golgi classique. C. r. Acad. Sci. Paris **180** (1925). — 61. Sur le prétendu contenu lipoidique de l'appareil de Golgi. C. r. Soc. Biol. Paris **92** (1925). — 62. Mise en evidence du vacuome (appareil réticulaire interne de Golgi) et du chondriome par les colorations vitales. Bull. Histol. appl. **2** (1925). — 63. **Rost, F.:** Über Kernfärbung an unfixierten Zellen und innerhalb des lebenden Tieres. Arch. ges. Physiol. **137** (1911). — 64. **Schulemann, W.:** Die vitale Färbung mit sauren Farbstoffen in ihrer Bedeutung für Anatomie, Physiologie, Pathologie u.

Pharmakologie. Biochem. Z. **80** (1917). — 65. Beiträge zur Vitalfärbung. Arch. mikrosk. Anat. **79** (1912). — 66. Vitalfärbung und Chemotherapie. Archives de Pharmacol. **250** (1912). — 67. **Storch, O.:** Cladocera. In: Biologie der Tiere Deutschlands. 1925. — 68. **Tschaschin, S.:** Über vitale Färbung der Chondriosomen in Bindegewebszellen mit Pyrrholblau. Fol. haemat. (Leipz.) **14** (1912). — 69. Über die ruhenden Wanderzellen und ihre Beziehungen zu den anderen Zellformen des Bindegewebes und zu den Lymphozyten. Ebenda **17** (1913). — 70. **Wankell, Fr.:** Über Reduktion basischer Farbstoffe im lebenden Protoplasma. Ber. naturforsch. Ges. Freiburg 1923. — 71. **Weismann, A.:** Beiträge zur Kenntnis der Daphnoiden. I. bis VII. Mitt. Z. Zool. 1876—80.

Curriculum vitae.

Ich, WALTHER LEBER, wurde am 4. Februar 1906 als Sohn des Stadtschreibers EMIL LEBER † und seiner Gattin HERMINE geb. MÜLLER in Laufenburg (Kt. Aargau) geboren. Nach Absolvierung der Gemeinde- und Bezirksschule meiner Heimatgemeinde besuchte ich das Gymnasium der Kantonsschule in Aarau, wo ich im Frühling 1926 die Maturitätsprüfung ablegte.

Daraufhin widmete ich mich an der Universität Basel dem Studium der Naturwissenschaften. Während dieser Zeit besuchte ich die Vorlesungen und Praktika der folgenden Herren Professoren und Dozenten: BRÖMSER, BUXTORF, FICHTER, FLATT, HÄBERLIN, HAGENBACH, HANDSCHIN, HASSINGER, HUNZIKER, JAEGER, LUDWIG, MENZEL, MOHRMANN, OSTROWSKI, PORTMANN, RUPE, SCHÜEPP, SENN, SPIRO, VISCHER, ZINKERNAGEL und ZSCHOKKE.

Anläßlich eines Studienaufenthaltes in der biologisch-physikalischen Arbeitsgemeinschaft in Prag von Februar bis August 1930 war ich ein Semester an der Deutschen Universität immatrikuliert und hörte daselbst die Vorlesungen der Herren Professoren und Dozenten: CORI, GICKLHORN und KNOLL. Meine Dissertation verfaßte ich unter der Leitung von Herrn Dr. GICKLHORN in Prag.

Allen meinen verehrten Lehrern möchte ich an dieser Stelle den besten Dank aussprechen.

Druck von Breitkopf & Härtel in Leipzig.